

## PCT COOPERATION TRE

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner  
 US Department of Commerce  
 United States Patent and Trademark  
 Office, PCT  
 2011 South Clark Place Room  
 CP2/5C24  
 Arlington, VA 22202  
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE  
 in its capacity as elected Office

<b>Date of mailing (day/month/year)</b> 27 April 2001 (27.04.01)	
<b>International application No.</b> PCT/JP00/05489	<b>Applicant's or agent's file reference</b> 00-042-PCT
<b>International filing date (day/month/year)</b> 17 August 2000 (17.08.00)	<b>Priority date (day/month/year)</b> 20 August 1999 (20.08.99)
<b>Applicant</b> TOMINAGA, Takanari et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:  
 13 February 2001 (13.02.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

<b>The International Bureau of WIPO</b> 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	<b>Authorized officer</b> R. Forax Telephone No.: (41-22) 338.83.38
--	---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## PCT

## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 00-042-PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/05489	国際出願日 (日.月.年) 17.08.00	優先日 (日.月.年) 20.08.99
出願人(氏名又は名称)  寶酒造株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 4 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☒ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☒ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## 第 I 欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第 1 ページの 2 の続き)

法第 8 条第 3 項 (PCT 17 条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 14, 16, 20, 21 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求の範囲 14, 16, 20, 21 は治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT 17 条(2)(a)(i) 及び PCT 規則 39.1(iv) の規定により、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

## 第 II 欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第 1 ページの 3 の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲 1 - 21 は、サイトカイン類産生調節を要する疾患の治療剤又は予防剤、一酸化窒素産生を要する疾患の治療剤又は予防剤、アレルギー性疾患の治療剤又は予防剤の 3 つの発明に係るものであり、それらは同一物質を有効成分とするものの、技術的特徴としてのそれら 3 つの治療用途が、互いに同一でもなく、対応するものでもないから、単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明には当たらない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K31/737, 35/80, 35/56, A61P37/02, 43/00,  
37/08//C08B37/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K31/737, 35/80, 35/56, A61P37/02, 43/00,  
37/08//C08B37/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Chem. abstr., Vol. 124, 1996 (Columbus, OH, USA) the abstract No. 332302, SHUN, Juyun et al, "An experimental study on immunoregulatory effect of fucoidan", 1995, 14(3), 990-13 (Chinese)	1-4, 7-11, 15, 17-19
X	J P, 9-255577, A (大日本インキ化学工業株式会社) 30-9月. 1997 (30. 09. 97) 【要約】、 【請求項3】 ファミリーなし	1-3, 5, 7-10, 1 2, 15, 17-19

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07. 11. 00

国際調査報告の発送日

21.11.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

滝原 下 浩一

4 C

9 2 8 4

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	J P, 1 0 - 7 2 3 6 2, A (協同乳業株式会社) 1 7. 3 月. 1 9 9 8 (1 7. 0 3. 9 8) 【要約】、【特許請求の範囲】 ファミリーなし	1-3, 6, 7-10, 13, 15, 17-19
X	GRANERT, Carl et al, "Effects of polysaccharide fucoidin on cerebrospinal fluid interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in pneumococcal meningitis in the rabbit", Infect. Immun., 1999, Vol. 67, No. 5, pp. 2071-2074, 特に、Abstract	1-3, 7-10, 15, 17-19
A	YOKOKAWA, K et al, "Heparin regulates endothelin production through endothelium-derived nitric oxide in human endothelial cells.", JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, 1993, Vol. 92, No. 4, pp. 2080-5, 文献全体	1-3, 7-10, 15, 17-19
A	WO, 8 8 / 0 5 3 0 1, A 1 (THE AUSTRALIAN NATIONAL UNIVERSITY) 2 8. 7 月. 1 9 8 8 (2 8. 0 7. 8 8) 文献全体 & E P, 3 5 5 0 8 8, A 1 & U S, 5 5 4 1 1 6 6, A & J P, 2 - 5 0 2 0 0 6, A & E P, 3 5 5 0 8 8, B 1 & E P, 6 3 1 7 8 4, A 1 & E P 6 3 1 7 8 4, B 1 & J P, 2 7 0 1 9 0 4, B 2 & J P, 0 9 - 3 2 8 4 3 1, A & I L, 8 5 1 4 5, A 1 & I L, 1 0 6 3 5 4, A 1 & C A, 1 3 1 6 8 2 8, A 1 & A U, 8 8 1 2 4 1 0, A 1 & A U, 6 0 5 8 3 9, B 2 & A T, 1 6 0 9 4 1, E & A T, 1 7 8 2 1 2, E	1-3, 7-10, 15, 17-19

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## P C T


## 国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 00-042-PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/05489	国際出願日 (日.月.年) 17.08.00	優先日 (日.月.年) 20.08.99
国際特許分類(IPC) Int. Cl <sup>7</sup> A61K31/737, 35/80, 35/56, A61P37/02, 43/00, 37/08//C08B37/00		
出願人(氏名又は名称)  寶酒造株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 5 ページからなる。
- ☒ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
- この附属書類は、全部で 2 ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☒ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☒ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 13.02.01	国際予備審査報告を作成した日 06.11.01	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 沓田 浩 	4C 9284
電話番号 03-3581-1101 内線 3452		

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に  
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
PCT規則70.16, 70.17)

☐ 出願時の国際出願書類

☒ 明細書 第 1-49 ページ、 出願時に提出されたもの  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 請求の範囲 第 1-21 項、 出願時に提出されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT 19条の規定に基づき補正されたもの  
請求の範囲 第 22-27 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 図面 第 1-13 ページ/図、 出願時に提出されたもの  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## III. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成

1. 次に関して、当該請求の範囲に記載されている発明の新規性、進歩性又は産業上の利用可能性につき、次の理由により審査しない。

☐ 国際出願全体

☒ 請求の範囲 14, 16, 20, 21

理由:

☒ この国際出願又は請求の範囲 14, 16, 20, 21 は、国際予備審査をすることを要しない次の事項を内容としている（具体的に記載すること）。

請求の範囲 14, 16, 20, 21 は治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT 34 条(4)(a)(i)及びPCT 規則67.1(iv)の規定により、この国際予備審査機関が予備審査をすることを要しない対象に係るものである。

☐ 明細書、請求の範囲若しくは図面（次に示す部分）又は請求の範囲 の記載が、不明確であるため、見解を示すことができない（具体的に記載すること）。

☐ 全部の請求の範囲又は請求の範囲 が、明細書による十分な裏付けを欠くため、見解を示すことができない。

☒ 請求の範囲 14, 16, 20-27 について、国際調査報告が作成されていない。

2. スクレオチド又はアミノ酸の配列表が実施細則の附属書C（塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン）に定める基準を満たしていないので、有効な国際予備審査をすることができない。

☐ 書面による配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。

☐ フレキシブルディスクによる配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## IV. 発明の単一性の欠如

1. 請求の範囲の減縮又は追加手数料の納付の求めに対して、出願人は、

- ☐ 請求の範囲を減縮した。
- ☐ 追加手数料を納付した。
- ☐ 追加手数料の納付と共に異議を申立てた。
- ☐ 請求の範囲の減縮も、追加手数料の納付もしなかった。

2. ☒ 国際予備審査機関は、次の理由により発明の単一性の要件を満たしていないと判断したが、PCT規則68.1の規定に従い、請求の範囲の減縮及び追加手数料の納付を出願人に求めないこととした。

3. 国際予備審査機関は、PCT規則13.1、13.2及び13.3に規定する発明の単一性を次のように判断する。

- ☐ 満足する。
- ☒ 以下の理由により満足しない。

請求の範囲1-21は、サイトカイン類産生調節を要する疾患の治療剤又は予防剤、一酸化窒素産生を要する疾患の治療剤又は予防剤、アレルギー性疾患の治療剤又は予防剤の3つの発明に係るものであり、それらは同一物質を有効成分とするものの、技術的特徴としてのそれら3つの治療用途が、互いに同一でもなく、対応するものでもないから、単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明には当たらない。

4. したがって、この国際予備審査報告書を作成するに際して、国際出願の次の部分を、国際予備審査の対象にした。

- ☐ すべての部分
- ☒ 請求の範囲 1-13, 15, 17-19 に関する部分

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性(N)	請求の範囲	3-5, 8-13, 19	有
	請求の範囲	1, 2, 6, 7, 15, 17, 18	無
進歩性(IS)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1-13, 15, 17-19	無
産業上の利用可能性(IA)	請求の範囲	1-13, 15, 17-19	有
	請求の範囲		無

## 2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

- 文献1: Chem. abstr., Vol.124, 1996(Columbus, OH, USA) the abstract No.332302, SHUN, Juyun et al, "An experimental study on immunoregulatory effect of fucoidan", 1995, 14(3), 990-13(Chinese)
- 文献2: JP, 9-255577, A (大日本インキ化学工業株式会社) 30. 9月. 1997 (30. 09. 97) ファミリーなし
- 文献3: JP, 10-72362, A (協同乳業株式会社) 17. 3月. 1998 (17. 03. 98) ファミリーなし
- 文献4: GRANERT, Carl et al, "Effects of polysaccharide fucoidin on cerebrospinal fluid interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in pneumococcal meningitis in the rabbit", Infect. Immun., 1999, Vol.67, No.5, pp.2071-2074,

文献1には、フコイダンを含むインターフェロン- $\gamma$ 産生調節剤が、文献2の【要約】、【請求項3】には、フコイダンを含むインターロイキン-12産生調節剤が記載されており、文献3の【要約】、【特許請求の範囲】には、海藻由来フコイダンを含む経口用アレルギー性疾患治療剤又は予防剤、IgE産生抑制剤が、文献4のAbstractには、フコイダンがINF- $\alpha$ 、IL-1の調節剤が記載されており、また、文献1-4には該剤製造のためのフコイダンの使用が、記載されている。よって、請求の範囲1, 2, 6, 7, 15, 17, 18は、新規性を有しない。

請求の範囲3-5, 8-13, 19は、インターフェロン- $\gamma$ 又はインターロイキン-12等のサイトカイン類産生調節を有する疾患の治療剤又は予防剤、または、サイトカイン類調節用、抗アレルギー用の食品、飲料又は飼料に関するものであり、文献1-4に記載はない。しかし、上記インターフェロン- $\gamma$ 又はインターロイキン-12等のサイトカイン類産生調節剤を、サイトカイン類産生調節を有する疾患の治療剤又は予防剤とすることは、当業者が容易に想到し得ることであるし、そのような機能を有する剤を食品、飲料又は飼料に添加して、機能食品とすることは、通常行われ得ることである。

よって、請求の範囲3-5, 8-13, 19は進歩性を有しない。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



16. フコイダン及び／又はその分解物を用いるサイトカイン類産生調節を要する疾患、一酸化窒素産生を要する疾患、又はアレルギー性疾患の治療又は予防方法。

17. フコイダン及び／又はその分解物を有効成分として含有するサイトカイン類産生調節剤、一酸化窒素産生誘導剤、抗アレルギー剤、又はIgE産生抑制剤。

18. サイトカイン類産生調節剤、一酸化窒素産生誘導剤、抗アレルギー剤、又はIgE産生抑制剤の製造のためのフコイダン及び／又はその分解物の使用。

19. サイトカイン類産生調節用食品、飲料又は飼料、一酸化窒素産生誘導用食品、飲料又は飼料、或いは抗アレルギー用食品、飲料又は飼料の製造のためのフコイダン及び／又はその分解物の使用。

20. フコイダン及び／又はその分解物を有効成分として使用するサイトカイン類産生調節方法、一酸化窒素産生誘導方法、アレルギー抑制方法、又はIgE産生抑制方法。

21. サイトカイン類産生調節、一酸化窒素産生誘導、アレルギー抑制又はIgE産生抑制のためのフコイダン及び／又はその分解物の使用。

22（追加）. フコイダン及び／又はその分解物を有効成分として含有することを特徴とするサイトカイン類産生調節用、一酸化窒素産生誘導用、又は抗アレルギー用の化粧料である、サイトカイン類産生調節用化粧料、一酸化窒素産生誘導用化粧料、或いは抗アレルギー用化粧料。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

2 3（追加）． フコイダンが藻類由来又は棘皮動物由来である請求項 2 2 記載の化粧料。

2 4（追加）． サイトカイン類がインターロイキン類又はインターフェロン類である請求項 2 2 又は 2 3 記載の化粧料。

2 5（追加）． インターフェロン類がインターフェロン- $\gamma$ である請求項 2 4 記載の化粧料。

2 6（追加）． インターロイキン類がインターロイキン-1 2 である請求項 2 4 記載の化粧料。

2 7（追加）． 抗アレルギー用化粧料が I g E 産生抑制用化粧料である請求項 2 2 又は 2 3 記載の化粧料。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

67  
20/04/99  
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

RECEIVED

JUN 20 2002

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

TECH CENTER 1600/2900

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 00-042-PCT	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/05489	International filing date (day/month/year) 17 August 2000 (17.08.00)	Priority date (day/month/year) 20 August 1999 (20.08.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 31/737, 35/80, 35/56, A61P 37/02, 43/00, 37/08 // C08B 37/00		
Applicant TAKARA SHUZO CO., LTD.		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>8</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>2</u> sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input checked="" type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 13 February 2001 (13.02.01)	Date of completion of this report 06 November 2001 (06.11.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

04/13/1991

1. 0. 0.

04/13/1991

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/05489

## I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:\*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:  
pages 1-49, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the claims:  
pages 1-21, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages 22-27, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the drawings:  
pages 1-13, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.  
These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/05489

## III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application.

☒ claims Nos. 14,16,20,21

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 14,16,20,21 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

See supplemental sheet for continuation of Box III. 1.

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. \_\_\_\_\_ are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. \_\_\_\_\_ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

☒ no international search report has been established for said claims Nos. 14,16,20-27

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.

☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP 00/05489

## Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III. 1.

Claims 14, 16, 20 and 21 pertain to methods for treatment of the human body by therapy, and thus relate to subject matter which does not require international preliminary examination by this International Preliminary Examining Authority, under the provisions of PCT Article 34(4)(a)(i) and PCT Rule 67.1(iv).

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/05489

## IV. Lack of unity of invention

1. In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has:

- ☐ restricted the claims.
- ☐ paid additional fees.
- ☐ paid additional fees under protest.
- ☐ neither restricted nor paid additional fees.

2. ☒ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is

- ☐ complied with.
- ☒ not complied with for the following reasons:

See supplemental sheet for continuation of Box IV. 3.

4. Consequently, the following parts of the international application were the subject of international preliminary examination in establishing this report:

- ☐ all parts.
- ☒ the parts relating to claims Nos. 1-13, 15, 17-19

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP 00/05489

## Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV. 3.

Claims 1 and 2 set out three inventions - therapeutic or prophylactic agents for conditions requiring regulation of cytokine production; therapeutic or prophylactic agents for conditions requiring production of nitrogen monoxide; and therapeutic or prophylactic agents for allergies - and although the active ingredients thereof are the same, the three therapeutic applications constituting the technical features thereof are not the same and do not correspond to one another. They do not, therefore, constitute a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/JP 00/05489

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	3-5, 8-13, 19	YES
	Claims	1, 2, 6, 7, 15, 17, 18	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-13, 15, 17-19	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-13, 15, 17-19	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

Document 1: Chem. Abstr., Vol. 124, 1996 (Columbus, OH, USA), abstract 332302, Juyun Shun et al., "An experimental study on the immunoregulatory effect of fucoidan", 1995, 14 (3), pp. 990-13 (Chinese)

Document 2: JP, 9-255577, A (Dainippon Ink & Chemical Co., Ltd.), 30 September 1997 (30.09.97) (Family: none)

Document 3: JP, 10-72362, A (Kyodo Nyugyo KK), 17 March 1998 (17.03.98) (Family: none)

Document 4: Carl Granert et al., "Effects of polysaccharide fucoidin on cerebrospinal fluid interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in pneumococcal meningitis in the rabbit", Infect. Immun., 1999, Vol. 67, No. 5, pp. 2071-2074

Document 1 discloses a regulator of interferon- $\gamma$  production containing fucoidan; Document 2, abstract and Claim 3, discloses a regulator of interleukin-12 production containing fucoidan; Document 3, abstract and claims, discloses oral therapeutic and prophylactic agents for allergic conditions, and suppressants of IgE

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

production, containing fucoidan from seaweed; and Document 4, abstract, discloses fucoidan as a regulator of INF- $\alpha$  and IL-1. Documents 1-4 also disclose the use of fucoidan in order to produce said preparations. Therefore, Claims 1, 2, 6, 7, 15, 17 and 18 are not novel.

Claims 3-5, 8-13 and 19 relate to therapeutic and prophylactic agents for conditions associated with regulation of production of cytokines such as interferon- $\gamma$  and interleukin 12, or to foods, drinks or feeds for regulating cytokines or combating allergies, and are not disclosed in Documents 1-4. However, a person skilled in the art could easily conceive of using a regulator of production of cytokines such as interferon- $\gamma$  or interleukin-12 mentioned above for treating or preventing conditions associated with regulation of cytokine production; and addition of agents having such functions to foods, feeds or drinks to give functional foods is conventional practice.

Therefore, Claims 3-5, 8-13 and 19 do not involve an inventive step.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001 年 3 月 1 日 (01.03.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/13925 A1

(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: A61K 31/737, 35/80, 35/56,  
A61P 37/02, 43/00, 37/08 // C08B 37/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/05489

(22) 国際出願日: 2000 年 8 月 17 日 (17.08.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願平11/234262 1999 年 8 月 20 日 (20.08.1999) JP  
特願2000/69223 2000 年 3 月 13 日 (13.03.2000) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 寶酒  
造株式会社 (TAKARA SHUZO CO., LTD.) [JP/JP]; 〒  
612-8061 京都府京都市伏見区竹中町609番地 Kyoto  
(JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 富永隆生 (TOM-  
INAGA, Takanari) [JP/JP]; 〒520-0242 滋賀県大津市  
本堅田4-22-2-204 Shiga (JP). 山下周作 (YAMASHITA,

Syusaku) [JP/JP]; 〒520-2133 滋賀県大津市野郷原  
1-14-3-202 Shiga (JP). 水谷滋利 (MIZUTANI, Shige-  
toshi) [JP/JP]; 〒521-1322 滋賀県蒲生郡安土町宮津  
1-86 Shiga (JP). 佐川裕章 (SAGAWA, Hiroaki) [JP/JP];  
〒525-0025 滋賀県草津市西洪川二丁目6-32 Shiga (JP).  
加藤郁之進 (KATO, Ikunoshin) [JP/JP]; 〒611-0028 京  
都府宇治市南陵町1-1-150 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 弁理士 細田芳徳 (HOSODA, Yoshinori); 〒  
540-0012 大阪府大阪市中央区谷町二丁目8番1号 大  
手前M2ビル 細田国際特許事務所内 Osaka (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,  
DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,  
IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,  
MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT,  
RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA,  
UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,  
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI,  
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(54) Title: REMEDIES

(54) 発明の名称: 治療剤

(57) Abstract: Remedies or preventives for diseases with a need for the regulation of the production of cytokines, diseases with a need for the production of nitrogen monoxide or allergic diseases characterized by containing as the active ingredient fucoidan and/or its decomposition product; and foods, drinks or feeds for regulating the production of cytokines, foods, drinks or feeds for inducing the production of nitrogen monoxide, antiallergic foods, drinks or feeds, etc. containing fucoidan and/or its decomposition product.

(57) 要約:

本発明は、フコイダン及び／又はその分解物を有効成分として含有することを特徴とするサイトカイン類産生調節を要する疾患、一酸化窒素産生を要する疾患、又はアレルギー性疾患の治療剤又は予防剤、並びにフコイダン及び／又はその分解物を含有してなるサイトカイン類産生調節用食品、飲料又は飼料、一酸化窒素産生誘導用食品、飲料又は飼料、或いは抗アレルギー用食品、飲料又は飼料などに関する。

WO 01/13925 A1



添付公開 類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明 細 書

## 治療剤

## 技術分野

本発明は水生生物由来の生理活性物質の医薬、食品、飲料又は飼料としての用途に関する。

## 背景技術

水生生物由来の生理活性物質としては、フコイダンが知られている。このフコイタンは藻類、棘皮動物等に含まれている硫酸化フコース含有多糖であり、硫酸化フコースを構成糖として含むものである。

フコイダンの生理作用としては癌増殖抑制活性、癌転移抑制活性、抗凝血活性、抗ウイルス活性等が知られており、医薬品としての用途開発が期待されている。

## 発明の開示

本発明はフコイダンの新たな生理作用を見出すことにあり、その目的はフコイダンのサイトカイン類産生調節作用等を利用した医薬、食品、飲料又は飼料を提供することにある。なお、本明細書において本発明の治療剤又は予防剤を医薬という場合がある。

本発明を概説すれば、本発明の第1の発明は、フコイタン及び／又はその分解物を有効成分として含有することを特徴とするサイトカイン類産生調節を要する疾患、一酸化窒素産生を要する疾患、又はアレルギー性疾患の治療剤又は予防剤に関する。

本発明の第2の発明は、フコイタン及び／又はその分解物を含有してなるサイ

トカイン類産生調節用食品、飲料又は飼料、一酸化窒素産生誘導用食品、飲料又は飼料、或いは抗アレルギー用食品、飲料又は飼料に関する。

また本発明の一態様としては、サイトカイン類産生調節を要する疾患、一酸化窒素産生を要する疾患、又はアレルギー性疾患を治療又は予防するためのフコイダン及び／又はその分解物の使用；サイトカイン類産生調節を要する疾患、一酸化窒素産生を要する疾患、又はアレルギー性疾患の治療剤又は予防剤の製造のためのフコイダン及び／又はその分解物の使用；或いはフコイダン及び／又はその分解物を用いるサイトカイン類産生調節を要する疾患、一酸化窒素産生を要する疾患、又はアレルギー性疾患の治療又は予防方法に関する。

さらに本発明の一態様としては、フコイダン及び／又はその分解物を有効成分として含有するサイトカイン類産生調節剤、一酸化窒素産生誘導剤、抗アレルギー剤、又はIgE産生抑制剤に関する。

さらに本発明の一態様としては、サイトカイン類産生調節剤、一酸化窒素産生誘導剤、抗アレルギー剤、又はIgE産生抑制剤の製造のためのフコイダン及び／又はその分解物の使用に関する。

さらに本発明の一態様としては、サイトカイン類産生調節用食品、飲料又は飼料、一酸化窒素産生誘導用食品、飲料又は飼料、或いは抗アレルギー用食品、飲料又は飼料の製造のためのフコイダン及び／又はその分解物の使用に関する。

さらに本発明の一態様としては、フコイダン及び／又はその分解物を有効成分として使用するサイトカイン類産生調節方法、一酸化窒素産生誘導方法、アレルギー抑制方法、又はIgE産生抑制方法に関する。

さらに本発明の一態様としては、サイトカイン類産生調節、一酸化窒素産生誘導、アレルギー抑制又はIgE産生抑制のためのフコイダン及び／又はその分解物の使用に関する。

本発明のさらに好ましい態様として、フコイダン及び／又はその分解物は抗原感作時、例えば抗原提示細胞とT細胞の抗原伝達時におけるサイトカイン類産生



調節に顕著な効果を有する。又、フコイダン及び／又はその分解物は抗原感作後のアレルギー性疾患の治療、特に抗原感作後の抗原特異的 I g E 産生の抑制に著効を有する。なお、本発明において、サイトカイン類産生調節とは、サイトカイン類の産生増強、産生促進等により、サイトカイン類の産生量を調節することを含む。

従って、本発明の一態様としては、フコイダン及び／又はその分解物を有効成分として含有することを特徴とする抗原感作時にサイトカイン類産生調節を要する疾患、又は抗原感作後のアレルギー性疾患の治療剤又は予防剤に関する。

また、本発明の一態様としては、フコイダン及び／又はその分解物を含有してなる抗原感作時のサイトカイン類産生調節用食品、飲料又は飼料、或いは抗原感作後の抗アレルギー用食品、飲料又は飼料に関する。

また本発明の一態様としては、抗原感作時にサイトカイン類産生調節を要する疾患、又は抗原感作後のアレルギー性疾患を治療又は予防するためのフコイダン及び／又はその分解物の使用；抗原感作時にサイトカイン類産生調節を要する疾患、又は抗原感作後のアレルギー性疾患の治療剤又は予防剤の製造のためのフコイダン及び／又はその分解物の使用；或いはフコイダン及び／又はその分解物を用いる抗原感作時にサイトカイン類産生調節を要する疾患、又は抗原感作後のアレルギー性疾患の治療又は予防方法に関する。

さらに本発明の一態様としては、フコイダン及び／又はその分解物を有効成分として含有する抗原感作時のサイトカイン類産生調節剤、抗原感作後の抗アレルギー剤、又は I g E 産生抑制剤に関する。

さらに本発明の一態様としては、抗原感作時のサイトカイン類産生調節剤、抗原感作後の抗アレルギー剤、又は抗原感作後の I g E 産生抑制剤の製造のためのフコイダン及び／又はその分解物の使用に関する。

さらに本発明の一態様としては、抗原感作時のサイトカイン類産生調節用食品、飲料又は飼料、或いは抗原感作後の抗アレルギー用食品、飲料又は飼料の製造

のためのフコイダン及び／又はその分解物の使用に関する。

さらに本発明の一態様としては、フコイダン及び／又はその分解物を有効成分として使用する抗原感作時のサイトカイン類産生調節方法、抗原感作後のアレルギー抑制方法、又は抗原感作後の I g E 産生抑制方法に関する。

さらに本発明の一態様としては、抗原感作時のサイトカイン類産生調節、抗原感作後のアレルギー抑制又は抗原感作後の I g E 産生抑制のためのフコイダン及び／又はその分解物の使用に関する。

本発明において使用するフコイダンに特に限定はないが、好ましくは藻類由来フコイダン又は棘皮動物由来フコイダンが例示される。

またフコイダンの分解物としては、例えばフコイダンの酸分解物、フコイダンの酵素分解物等が使用できる。

本発明に使用するフコイダン、フコイダンの分解物、例えばフコイダンの酸分解物、フコイダンの酵素分解物としては、サイトカイン類産生調節作用、一酸化窒素産生誘導作用、又は抗アレルギー作用、例えば I g E 産生抑制作用等を示すものであれば特に限定はなく、かかる作用等を指標として適宜調製することができる。

また、本明細書にいうサイトカイン類とは、特にフコイダン又はその分解物が産生調節作用を示し得るサイトカイン類をいい、例えばインターロイキン類（例えばインターロイキン-12）、インターフェロン類（例えばインターフェロン- $\gamma$ ）が例示される。

さらに、抗アレルギー作用とは、フコイダン又はその分解物が示し得るアレルギー抑制作用をいい、I g E 産生抑制作用が例示される。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、ガゴメ昆布由来フコイダンのDEAE-セルロファインA-800カラム溶出パターンを示す図である。

第2図は、7-12SFd-Fを添加して培養した時の培地中の $\text{NO}_2^-$ 濃度を示す図である。

第3図は、I画分を添加して培養した時の培地中の $\text{NO}_2^-$ 濃度を示す図である。

第4図は、II画分を添加して培養した時の培地中の $\text{NO}_2^-$ 濃度を示す図である。

第5図は、III画分を添加して培養した時の培地中の $\text{NO}_2^-$ 濃度を示す図である。

第6図は、陽性対照のLPSを添加して培養した時の培地中の $\text{NO}_2^-$ 濃度を示す図である。

第7図は、フコイダン及びその分解物のIFN- $\gamma$ 産生誘導作用を示す図である。

第8図は、フコイダン及びその分解物のIL-12産生誘導作用を示す図である。

第9図は、ガゴメ昆布由来フコイダンのマウス脾臓リンパ球の細胞傷害性免疫増強作用を示す図である。

第10図は、G-フコイダンのIFN- $\gamma$ 産生誘導作用を示す図である。

第11図は、G-フコイダンのIL-12産生誘導作用を示す図である。

第12図は、フコイダンのIFN- $\gamma$ 又はIL-12産生誘導作用に対する各種抗体の作用を示す図である。

第13図は、各フコイダンのIFN- $\gamma$ 産生誘導作用を示す図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明に使用するフコイダンとは硫酸化フコースを構成成分として含む多糖であり、サイトカイン類産生調節作用、例えば抗原提示細胞(APC)とT細胞との抗原伝達反応時におけるインターフェロン- $\gamma$ 産生調節作用、インターロイキ

ンー 1 2 産生調節作用；一酸化窒素産生誘導作用；又は抗アレルギー作用、例えば I g E 産生抑制作用を有するものであれば特に限定はない。例えば、藻類であるガゴメ昆布、トロロ昆布、ヒバマタ、オキナワモズク、ワカメ、クロメ、アラメ、カジメ、ジャイアントケルプ、レソニア ニグレセンス、アスコフィラム ノドッサム等の昆布目、ながもつも目、ひばまた目等の海藻は特に本発明の使用に好適なフコイタンを多く含んでおり、原料として好適である。また、棘皮動物、例えばナマコ、ウニ、ヒトデ等由来のフコイタンを使用してもよい。

これらのフコイタンの調製はそれぞれ公知の方法で調製すれば良く、精製物又は当該フコイタン含有物等を本発明に使用することができる。

例えばガゴメ昆布からフコイタンを調製し、該フコイタンはさらにグルクロン酸含有フコイタン（U－フコイタンと称す）とグルクロン酸非含有フコイタン（F－フコイタンと称す）とに分離することができる。それらのフコイタンは、本発明の治療剤又は予防剤等の有効成分として使用することが出来る。また、ガゴメ昆布から硫酸化フコガラクトン（G－フコイタンと称す）を調製し使用することもできる。

U－フコイタン及びF－フコイタンは、ガゴメ昆布からフコイタンを調製後、陰イオン交換樹脂、界面活性剤等を用いて分離される。ガゴメ昆布由来のU－フコイタン及びF－フコイタンの存在比は重量比で約 1：2 であり、U－フコイタンはフコース、マンノース、ガラクトース、グルクロン酸等を含み硫酸含量は約 20 重量％、F－フコイタンはフコースとガラクトースを含み、硫酸含量は約 50 重量％、分子量は両物質共に約 20 万を中心に分布している（第 18 回糖質シンポジウム要旨集、第 159 頁、1996 年）。

例えばガゴメ昆布から調製したフコイタン溶液を DEAE－セルロファイン A－800 カラムにアプライ後、NaCl 含有緩衝液にて濃度勾配法により溶出させることにより、U－フコイタンと F－フコイタンとに分離することができる。第 1 図にその 1 例を示す。すなわち第 1 図は U－フコイタンと F－フコイタンの

分離を示す図であり、図中前ピークがU-フコイダン、後ピークがF-フコイダンである。

また、ガゴメ昆布由来フコイダンをアルテロモナス *sp.* SN-1009 (FERM BP-5747) が産生するF-フコイダン特異的分解酵素、及びフラボバクテリウム *sp.* SA-0082 (FERM BP-5402) が産生するU-フコイダン特異的分解酵素で分解し、分解物を除去することにより、前出G-フコイダンを精製することができる。

また例えばヒバマタ由来フコイダン、オキナワモズク由来フコイダン、ワカメ由来フコイダン、ワカメメカブ由来フコイダンもそれぞれ公知の方法で調製し、本発明に使用することができる。

本発明において好適に用いられる棘皮動物由来のフコイダンとしては、例えば特開平4-91027号公報に記載のナマコに含有されるフコイダンを挙げることができ、当該公報記載の方法にてナマコより当該フコイダンを調製することができる。

また本発明に使用するサイトカイン類産生調節作用、一酸化窒素産生誘導作用、抗アレルギー作用を有するフコイダンの分解物は、酵素学的方法、化学的方法、物理的方法等の公知の方法にて、目的のサイトカイン類産生調節作用、一酸化窒素産生誘導作用、抗アレルギー作用を有する分解物を選択し、使用することができる。

かかるフコイダンの分解物の調製方法としては、例えば酸分解法があり、当該フコイダンを酸分解することにより、サイトカイン類産生調節作用、免疫賦活作用、一酸化窒素産生誘導作用、抗アレルギー作用を有する分解物を調製することができる。

前記酸分解法における酸分解の条件は、サイトカイン類産生調節作用、一酸化窒素産生誘導作用、抗アレルギー作用を有する分解物（以下、本発明の分解物と称す）が生成する条件であれば、特に限定はない。

例えばフコイタンを酸に溶解またはけん濁し、反応させることにより、本発明の分解物が生成する。また、反応時に加熱することにより、本発明の分解物の生成に必要な時間が短縮される。

フコイタンを溶解またはけん濁する酸の種類は、特に限定するものではないが、塩酸、硫酸、硝酸等の無機酸、クエン酸、ギ酸、酢酸、乳酸、アスコルビン酸等の有機酸、また陽イオン交換樹脂、陽イオン交換繊維、陽イオン交換膜等の固体酸が使用可能である。

酸の濃度も特に限定はないが、好ましくは0.0001～5規定、より好ましくは0.01～1規定程度の濃度で使用可能である。また、反応温度も特に限定はないが好ましくは0～200℃、より好ましくは20～130℃に設定すれば良い。

また、反応時間も特に限定するものではないが、好ましくは数秒～数日に設定すれば良い。酸の種類と濃度、反応温度及び反応時間は本発明の分解物の生成量、分解物の重合度により適宜選択すれば良い。例えば、本発明の分解物の製造に際しては、好ましくは、クエン酸、乳酸、リンゴ酸等の有機酸を使用し、酸の濃度は数10mM～数M、加熱温度は50～110℃、より好適には70～95℃、加熱時間は数分～24時間の範囲から適宜選択することにより、本発明の分解物を調製することができる。フコイタンの酸分解物としては、ガゴメ昆布由来フコイタンの酸分解物が例示され、当該分解物はサイトカイン類産生調節作用、特にAPCとT細胞との抗原伝達反応時におけるインターフェロン $\gamma$ 産生調節作用、一酸化窒素産生誘導作用、及び抗アレルギー作用の強い新生理機能を有する食物繊維として使用することができる。

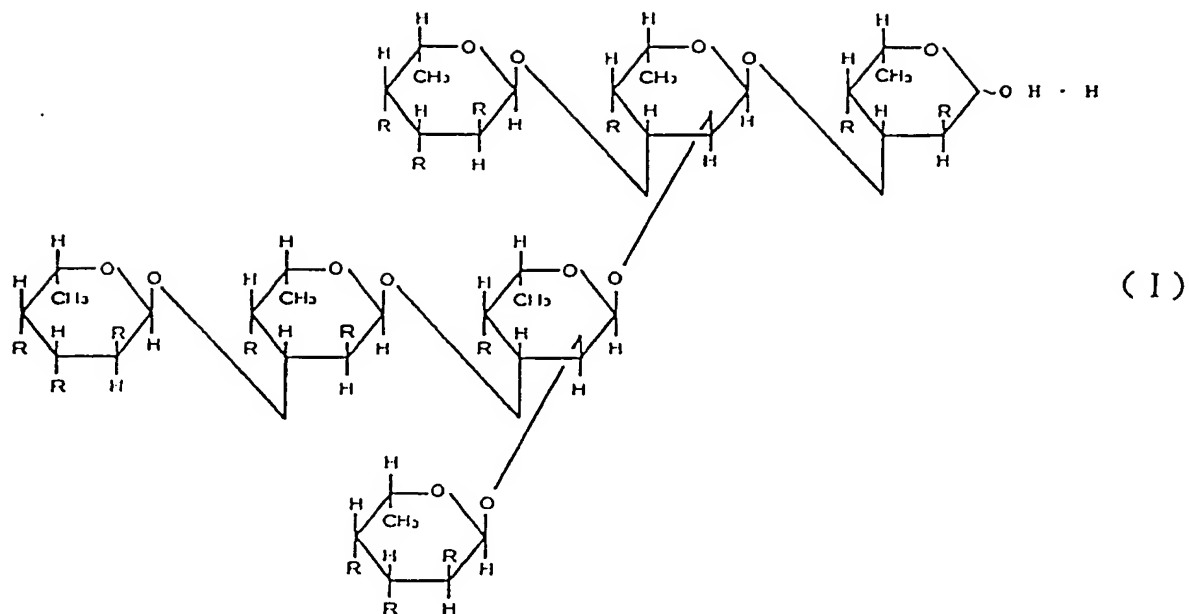
本発明の分解物はサイトカイン類産生調節作用、一酸化窒素産生誘導作用、抗アレルギー作用を指標として分画することができ、例えば酸分解物をゲルろ過法、分子量分画膜による分画法等によりさらに分子量分画することができる。

ゲルろ過法の例としては、セルロファインGCL-300を使用し、例えば分

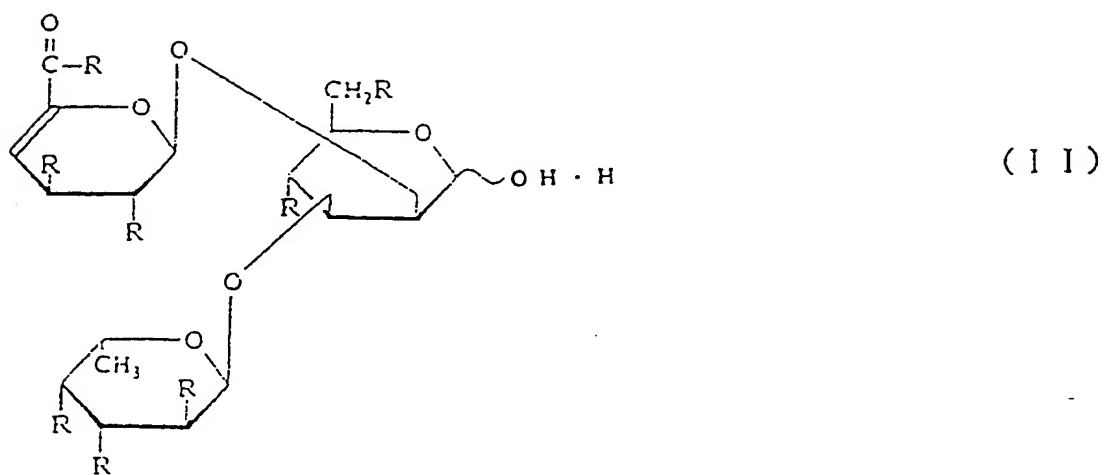
分子量25000超、分子量25000～10000超、分子量10000～5000超、分子量5000以下等の任意の分子量画分を調製でき、セルロファインGCL-25を用い、例えば分子量5000以下の画分を分子量5000～3000超、分子量3000～2000超、分子量2000～1000超、分子量1000～500超、分子量500以下等の任意の分子量画分に調製することができる。

また、限外ろ過膜を用いて工業的に分子量分画を行うこともでき、例えばダイセル社製FE10-FUSO382を用いることにより分子量3000以下の画分を、若しくは同FE-FUS-T653を使用することによって分子量600以下の画分を調製することができる。更にナノフィルター膜を用いることにより分子量500以下の画分を得ることもでき、これらのゲルろ過法、分子量分画法を組み合わせることにより、任意の分子量画分を調製することができる。

本発明で利用できるサイトカイン類産生調節作用、一酸化窒素産生誘導作用、抗アレルギー作用を有するフコイダンの分解物としては、下記の式(I)～式(IV)で表される化合物が例示され、これらの化合物は国際公開第97/26896号パンフレット、国際出願番号PCT/JP99/00606号明細書、国際出願番号PCT/JP00/00965号明細書に記載の方法で調製することができる。また、本発明のフコイダンの分解物としては、国際公開第97/26896号パンフレット、国際出願番号PCT/JP99/00606号明細書、国際出願番号PCT/JP00/00965号明細書に記載のフコイダンの分解物も包含される。なお、式(I)で表される化合物の繰返し構造を有するフコイダン、及びオリゴ糖も本発明において好適に使用することができる。

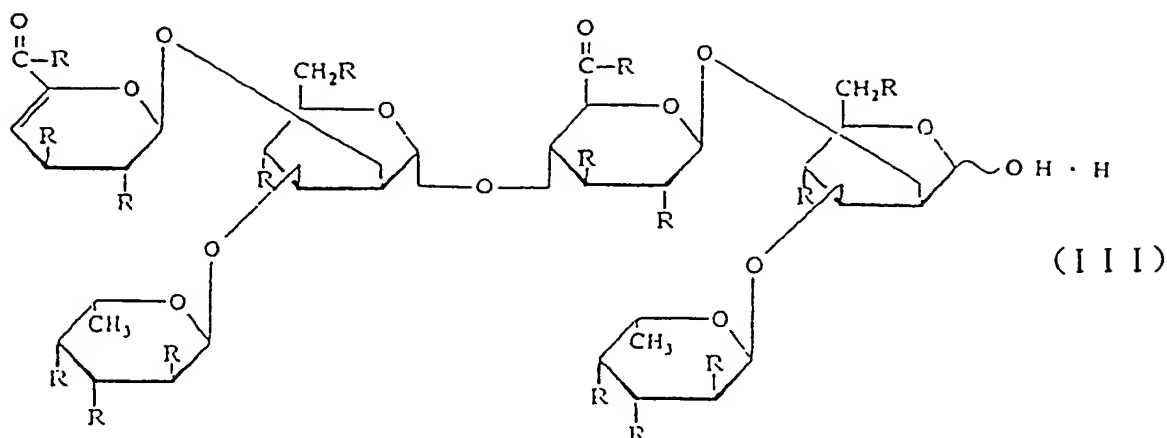


(式中、RはOH又はOSO<sub>3</sub>Hである。)

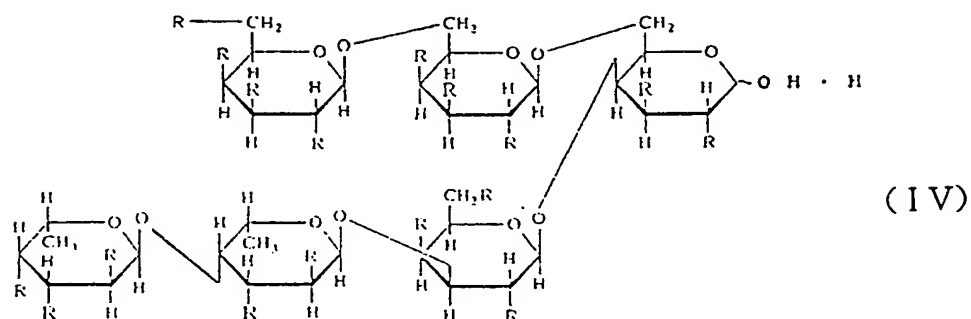


(式中、RはOH又はOSO<sub>3</sub>Hである。)





(式中、RはOH又はOSO<sub>3</sub>Hである。)



(式中、RはOH又はOSO<sub>3</sub>Hである。)

なお、式(I)で表される化合物の例としては後述の式(V)で表される化合物が挙げられる。

式(I)で表される化合物は、例えば前記F-フコイタンを、アルテロモナス sp. SN-1009 (FERM BP-5747) が産生するエンド型硫酸化多糖分解酵素 (F-フコイタン特異的分解酵素) で処理し、その分解物より精

製することにより得ることができる。当該化合物中の硫酸基の含量、部位についてはその分解物中より、任意のものを精製することができる。また当該分解物中には式（I）で表される化合物の多量体も含有されており、目的に応じて分離、精製することができる。

式（I I）で表わされる化合物、及び式（I I I）で表される化合物は、それぞれ例えば前記U－フコイタンを、フラボバクテリウム *sp.* SA－0082（FERM BP－5402）が産生するエンド型硫酸化多糖分解酵素（U－フコイタン特異的分解酵素）で処理し、その分解物より精製することにより得ることができる。当該化合物中の硫酸基の含量、部位についてはその分解物中より、任意のものを精製することができる。また当該分解物中には式（I I）で表される化合物の二重結合のない化合物を基本骨格とする、その多量体も含有されており、目的に応じて分離、精製することができる。

式（I V）で表される化合物は、例えばフラボバクテリウム *sp.* SA－0082（FERM BP－5402）より得られるG－フコイタンを特異的に分解するエンド型硫酸化多糖分解酵素（G－フコイタン特異的分解酵素）をG－フコイタンに作用させることにより当該G－フコイタンの分解物を調製し、当該分解物より精製することにより得ることができる。当該化合物中の硫酸基の含量、部位についてはその分解物中より、任意のものを精製することができる。また当該分解物中には式（I V）で表される化合物を基本骨格とする、その多量体も含有されており、目的に応じて分離、精製することができる。

なお、フコイタン又はその分解物のサイトカイン類産生調節作用、一酸化窒素産生誘導作用、又は抗アレルギー作用は、例えば後述の実施例1、2、7及び8に記載の方法により検定する。被検対象であるフコイタン又はその分解物が、かかる作用を示す場合、それを指標として本発明に用い得るフコイタン又はその分解物を選択する。

本発明において、フコイタン又はその分解物により産生調節され得るサイトカ

イン類とは特に限定はないが、例えばインターロイキン（IL）-1～18、インターフェロン（IFN）- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、リンホトキシン、腫瘍壊死因子（TNF）、幹細胞因子（SCF）、顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、顆粒球・コロニー刺激因子（G-CSF）、マクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）等が例示される。

これらのサイトカイン類は遅延型過敏反応や標的細胞障害をはじめ、種々の細胞性免疫反応の発現や調節に関与するもの（IL-2、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ 等）、抗体産生機構において、その調節機能に関与するもの（IL-2、IL-4、IL-5、IL-6等）、腫瘍細胞に対して直接増殖抑制作用や破壊作用を示すもの（TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ 、IFN等）、骨髓における造血幹細胞や前駆細胞の増殖・分化を促進するもの（IL-1、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IL-11、GM-CSF、G-CSF、M-CSF等）、炎症反応に関与するもの（IL-1、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ 、IFN等）、アレルギー反応に関与するもの（IL-3、IL-4、IL-5等）、NK細胞活性を増強するもの（IL-12）等がある。なお、本発明において使用するフコイダン及び／又はその分解物が有するサイトカイン類産生調節作用とは、ウイルス感染、或いは癌等、体内に排除すべき抗原が存在し、細胞性免疫の増強が必要なときに選択的に生じさせ得るサイトカイン類の産生調節作用、例えばIFN- $\gamma$ 、IL-12の産生誘導作用や、それらの産生増強作用又は産生促進作用をいう。それゆえ、該フコイダン及び／又はその分解物は不必要な状態での免疫系の活性化やその増強を生じさせず、従ってアレルギー症状、自己免疫疾患等の疾病を惹起することがなく、極めて安全かつ有効な成分である。また、該フコイダン及び／又はその分解物は、例えばリンパ球の細胞傷害活性を増強し、細胞傷害性免疫の増強をももたらし得る。

従って、フコイダン及び／又はその分解物を使用し、これらのサイトカイン類

の産生を調節することにより、サイトカイン類産生調節を要する疾患、例えば癌等の細胞性免疫反応の発現や調節を要する疾患、自己免疫症のような抗体産生の調節を要する疾患、貧血、糖尿病等の細胞の分化を要する疾患、敗血症性ショック、炎症性腸疾患、慢性関節リウマチ、多発性硬化症、ブドウ膜炎等の炎症の抑制を要する疾患の治療又は予防が可能となる。

本発明で使用するフコイダン及びその分解物はサイトカイン類産生調節能を有し、これらの化合物を有効成分としてサイトカイン類の産生調節を要する上記疾患の治療剤又は予防剤を製造することができる。

また、本発明で使用するフコイダン及びその分解物は一酸化窒素産生誘導作用を有し、これらの化合物を有効成分として使用し、一酸化窒素産生を要する疾患、例えば血管平滑筋の弛緩、栓球、顆粒球及び単球の血管壁への付着の抑制、分泌性平滑筋の細胞の増殖阻止等を要する動脈硬化症の治療又は予防が可能となる。また、該フコイダン及びその分解物はかかる作用を介した免疫賦活効果をも奏する。なお、一酸化窒素産生誘導作用には、誘導増強作用若しくは誘導促進作用も含む。

さらに、本発明で使用するフコイダン及びその分解物は、抗アレルギー作用、例えばIgE産生抑制作用を有し、これらの化合物を有効成分として使用し、アレルギー性疾患、例えばIgE産生により媒介されるか悪化する症状、例えばIgEが起因となるアレルギー性疾患、例えば気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、アレルギー性結膜炎、じん麻疹、アナフィラキシーショック等を治療又は予防することができる。

なお、前記フコイダンの特定の分画物、特にF-フコイダン、U-フコイダン、G-フコイダンは、その基本構造が初めて明確となったフコイダン分画物であるという点において、各分画物に特異的に作用する酵素を用いて調製される各分解物、特にその分解物の分画物、例えば式(I)～(IV)等の化合物は分子量も、フコイダンと比較し低分子であり、かつフコイダンと同等の生理活性を有す

るという点において、構造、組成、物性が不明確な単に分離されたフコイダン若しくはフコイダン含有物に比べて顕著に優れる。

本発明においては、かかるフコイダン及び／又はその分解物を有効成分として含有するサイトカイン類産生調節を要する疾患、一酸化窒素産生を要する疾患、又はアレルギー性疾患の治療剤又は予防剤を提供する。

特に、本発明のサイトカイン類産生調節を要する疾患の治療剤又は予防剤としては、有効性の観点から、好ましくはインターロイキン類又はインターフェロン類産生調節を要する疾患の治療剤又は予防剤であり、より好ましくはインターフェロン $\gamma$ 又はインターロイキン-12産生調節を要する疾患の治療剤又は予防剤である。また、本発明のアレルギー性疾患の治療剤又は予防剤は抗原感作後のIgE産生抑制作用を有すること、経口投与で抗原感作後のIgE産生抑制作用を有する点において極めて有用な抗アレルギー剤である。さらに、本発明のアレルギー性疾患の治療剤又は予防剤は、特に花粉症の様に抗原感作された症状においての抗原特異的IgE産生を経口投与で抑制し得るという点において顕著に優れる。従って、アレルギー性疾患の治療剤又は予防剤としては、IgE産生抑制を要する疾患の治療剤又は予防剤が好ましい。

本発明の治療剤又は予防剤は、フコイダン及び／又はその分解物を有効成分とし、これを公知の医薬用担体と組合せ製剤化することにより得られる。当該製剤の製造は一般的には、フコイダン及び／又はその分解物を薬学的に許容できる液状又は固体状の担体と配合し、かつ必要に応じて溶剤、分散剤、乳化剤、緩衝剤、安定剤、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤等を加えて、錠剤、顆粒剤、散剤、粉末剤、カプセル剤等の固形剤、一般液剤、懸濁剤、乳剤等の液剤とすることにより行う。また、使用直前に適当な担体の添加によって液状となし得る乾燥品とすることもできる。

医薬用担体は、本発明の治療剤又は予防剤の投与形態及び剤型に応じて適宜選択することができる。

経口剤の場合は、例えばデンプン、乳糖、白糖、マンニット、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩等が利用される。また経口剤の調製に当っては、更に結合剤、崩壊剤、界面活性剤、潤沢剤、流動性促進剤、矯味剤、着色剤、香料等を配合することもできる。

一方、非経口剤の場合は、常法に従い本発明の有効成分であるフコイダン及び／又はその分解物を希釈剤としての注射用蒸留水、生理食塩水、ブドウ糖水溶液、注射用植物油、ゴマ油、ラッカセイ油、ダイズ油、トウモロコシ油、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等に溶解ないし懸濁させ、必要に応じ、殺菌剤、安定剤、等張化剤、無痛化剤等を加えることにより調製することができる。

本発明の治療剤又は予防剤は、製剤形態に応じた適当な投与経路で投与することができる。また、投与方法も特に限定はなく、内用、外用及び注射によることができる。注射剤は、例えば静脈内、筋肉内、皮下、皮内等に投与し得、外用剤には座剤等も包含される。なお、かかる治療剤又は予防剤は、その有効性の観点から、経口用治療剤又は経口用予防剤とするのが好ましい。

本発明の治療剤又は予防剤としての投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され一定ではないが、一般には製剤中に含有されるフコイダン及び／又はその分解物の量で好ましくは成人1日当り0.1～2000mg/kgとなる量である。従って、本発明の治療剤又は予防剤におけるフコイダン及び／又はその分解物の含有量は、当該治療剤又は予防剤を投与することにより少なくとも前記範囲でフコイダン及び／又はその分解物が投与され得るように適宜決定すればよい。なお、投与量は種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の治療剤又は予防剤は、そのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。またフコイダン及び／又はその分解物をサイトカイン類産生調節用飲食

品又は飼料、一酸化窒素産生誘導用飲食品又は飼料、抗アレルギー用飲食品又は飼料の原料として用いても良い。

また本発明の一態様として、サイトカイン類産生調節を要する疾患、一酸化窒素産生を要する疾患、又はアレルギー性疾患を治療又は予防するためのフコイダン及び／又はその分解物の使用；或いはフコイダン及び／又はその分解物を用いるサイトカイン類産生調節を要する疾患、一酸化窒素産生を要する疾患、又はアレルギー性疾患の治療又は予防方法を提供する。

サイトカイン類産生調節を要する疾患、一酸化窒素産生を要する疾患、又はアレルギー性疾患の治療又は予防を行うには、例えばフコイダン及び／又はその分解物を前記例示する範囲で投与すればよく、例えば本発明の治療剤又は予防剤を適宜投与する。

さらに本発明の一態様として、フコイダン及び／又はその分解物を有効成分として含有するサイトカイン類産生調節剤、例えばIFN- $\gamma$ 産生調節剤、IL-12産生調節剤；一酸化窒素産生誘導剤；又は抗アレルギー剤、例えばIgE産生抑制剤を提供する。これらの薬剤は上記治療剤又は予防剤に準じて製造され得る。例えばサイトカイン類産生調節剤は、サイトカイン類の機能研究、サイトカイン類が関連する疾病用医薬のスクリーニングに有用である。これらの薬剤の剤型、使用量等は、各用途に応じて当該薬剤により奏される所望の効果が得られるようであれば特に限定されるものではない。なお、前記例示する疾患等に対し適用することもできる。

さらに本発明の一態様として、サイトカイン類産生調節、一酸化窒素産生誘導、アレルギー抑制又はIgE産生抑制のためのフコイダン及び／又はその分解物の使用；又はフコイダン及び／又はその分解物を用いるサイトカイン類産生調節方法、一酸化窒素産生誘導方法、アレルギー抑制方法、又はIgE産生抑制方法を提供する。

サイトカイン類産生調節、一酸化窒素産生誘導、アレルギー抑制又はIgE産

生抑制を行うには、例えば前記サイトカイン類産生調節剤、一酸化窒素産生誘導剤等を各用途に応じて所望の効果が得られるように使用すればよい。

本発明に使用されるフコイダン又はその分解物の推定される薬理作用を以下に説明する。

リンパ球からのIFN- $\gamma$ の産生誘導には、Con A等のマイトジェンにおけるT細胞の直接刺激による誘導、および抗原感作時における抗原提示細胞（APC）とT細胞との細胞間相互作用による誘導が知られている。前者はマイトジェンのT細胞レセプターへの直接結合による誘導であり、後者はAPCとT細胞との各レセプターの刺激、及びそれによりAPCから産生されたIL-12による産生誘導である。IL-12産生誘導に関与するレセプターの反応としてT細胞レセプター（TCR）／主要組織適合性複合体（MHC）の他、副刺激としてT細胞側のCD40LとAPC側のCD40、及びT細胞側のCD28とAPC側のB7の各反応が知られている。

従来、ラミナリア ジャポニカ（*Laminaria japonica*）由来のフコイダンが、正常マウス由来の脾臓リンパ球からのIFN- $\gamma$ 産生を誘導し、NK細胞の活性化を増強する（中国海洋薬物雑誌、1995第3期、9～13）との報告があるが、これは静止期にあるナイーブT細胞への直接刺激による誘導である。

一方、今回、本発明者らが確認したガゴメ昆布由来フコイダン、及びその画分のIFN- $\gamma$ の産生誘導作用に関しては、実施例に示すように、リンパ球の直接刺激、またはアロ抗原刺激時における誘導作用は認められず、感作リンパ球の抗原刺激下でのみIFN- $\gamma$ 産生を増強させた。さらにこのときIL-12の産生誘導も認められた。この抗原提示反応時におけるIFN- $\gamma$ 産生誘導作用は抗IL-12抗体により産生されたIL-12を中和したときに約50%が抑制され、抗CD40抗体及び抗CD28抗体でこれらのレセプターの反応を阻害したときには完全に抑制された。このことより、ガゴメ昆布由来フコイダン、及びその画分のIFN- $\gamma$ の産生誘導の作用機序に関して、抗原提示反応時においてAP



Cに働いてIL-12産生を増強させたことによるもの、及びAPCとT細胞との相互作用により活性化された状態にあるT細胞に働いて誘導した可能性が推測される。

静止期のT細胞に対する直接誘導作用を見ている前記報告に記載のフコイダンと本発明で使用するガゴメ昆布由来フコイダンは異なり、その結果は、全く異なる作用を示すものである。

また、抗原提示細胞の一つであるマクロファージの細胞株を用いた系で、フコイダン及びその分解物は、一酸化窒素産生を誘導し、その誘導により免疫賦活効果があることを示しているが、この系においても、フコイダン及びその分解物によるIFN- $\gamma$ の産生誘導は見られず、本発明に使用するフコイダン及びその分解物には、IFN- $\gamma$ を直接産生誘導する活性はなく、一酸化窒素の産生増強とIL-12の産生増強が平行であると考えられることから、本発明によるフコイダンおよびその分解物によるIFN- $\gamma$ の産生増強は、静止期T細胞の直接刺激による誘導ではなく、抗原提示反応時においてAPCに働いてIL-12産生を増強させたことによるもの、及びAPCとT細胞との相互作用により活性化された状態にあるT細胞に働いて誘導した可能性が推測される。この点からも本発明に使用されるフコイダン及びその分解物は直接誘導作用を見ている前記報告とは、全く異なる作用を示すものである。

なお、IFN- $\gamma$ はT細胞(Th1)のT細胞レセプターが抗原提示細胞(APC)等により刺激されたとき産生され、さらにAPCから産生されるIL-12によって産生が増強される。IFN- $\gamma$ はウイルス、真菌感染、および癌疾患等においてNK細胞、マクロファージ等の細胞性免疫を活性化させ、生体防御能の増強に働く。

一方、IFN- $\gamma$ は喘息、花粉症、アトピー性皮膚炎等に代表されるアレルギー性疾患の発生の原因とされているTh2細胞の活性化を抑制することが知られている。Th2細胞は免疫グロブリンE抗体(IgE)の産生を誘導する。産生

された I g E はマスト細胞の細胞膜上のレセプターに結合し、マスト細胞からのケミカルメディエーターの放出を惹起する。この炎症性のメディエーターが直接の原因となりアレルギー症状が発症する。

本発明の抗アレルギー剤は抗原感作後の経口投与において、I g E 産生を抑制し、発症後の喘息、花粉症、アトピー性皮膚炎等に代表されるアレルギー性疾患の症状改善に極めて有用である。

さらに、本発明はフコイダン及び／又はその分解物を含有してなるサイトカイン類産生調節用食品又は飲料、一酸化窒素産生誘導用食品又は飲料、或いは抗アレルギー用食品又は飲料を提供する。

特に、本発明のサイトカイン類産生調節用食品又は飲料としては、有効性の観点から、好ましくはインターロイキン類又はインターフェロン類産生調節用食品又は飲料であり、より好ましくはインターフェロン $\gamma$ 又はインターロイキン-12 産生調節用食品又は飲料である。

また、本発明の抗アレルギー用食品又は飲料は抗原感作後の I g E 産生抑制作用を有すること、摂取により抗原感作後の I g E 産生抑制作用を発揮する点において極めて有用な食品又は飲料である。従って、抗アレルギー用食品又は飲料としては、I g E 産生抑制用食品又は飲料が好ましい。

なお、後述の飼料についても、同様の観点から、これら作用を有する飼料が好ましい。

かかる食品又は飲料は、そのサイトカイン類産生調節作用、一酸化窒素産生誘導作用、抗アレルギー作用により、フコイダン又はその分解物に感受性を示すサイトカイン類産生調節を要する疾患、一酸化窒素産生を要する疾患、アレルギー性疾患の症状改善、予防に極めて有用である。

なお、本発明の食品、飲料又は飼料、後述の化粧料にいう「含有」の語は、含有、添加、希釈の意を含むものであり、含有とは食品、飲料等に本発明で利用される有効成分が含まれるという態様を、添加とは食品、飲料等の原料に、本発明

で使用される有効成分を添加するという態様を、希釈とは本発明で使用される有効成分に、食品、飲料等の原料を添加するという態様をいうものである。

本発明の食品又は飲料の製造法は公知の方法に従えばよく特に限定はない。例えば、かかる製造法としては調理、加工及び一般に用いられている食品又は飲料の製造法を挙げることができ、製造された食品又は飲料にサイトカイン類産生調節作用、一酸化窒素産生誘導作用、及び抗アレルギー作用を有するフコイダン及び／又はその分解物が有効成分として含有されていれば良い。

本発明の食品又は飲料は特に限定はないが、フコイダン及び／又はその分解物を有効成分として含有する、例えば穀物加工品（小麦粉加工品、デンプン類加工品、プレミックス加工品、麺類、マカロニ類、パン類、あん類、そば類、麴、ビーフン、はるさめ、包装餅等）、油脂加工品（可塑性油脂、てんぷら油、サラダ油、マヨネーズ類、ドレッシング等）、大豆加工品（豆腐類、味噌、納豆等）、食肉加工品（ハム、ベーコン、プレスハム、ソーセージ等）、水産製品（冷凍すりみ、かまぼこ、ちくわ、はんぺん、さつま揚げ、つみれ、すじ、魚肉ハム、ソーセージ、かつお節、魚卵加工品、水産缶詰、つくだ煮等）、乳製品（原料乳、クリーム、ヨーグルト、バター、チーズ、練乳、粉乳、アイスクリーム等）、野菜・果実加工品（ペースト類、ジャム類、漬け物類、果実飲料、野菜飲料、ミックス飲料等）、菓子類（チョコレート、ビスケット類、菓子パン類、ケーキ、餅菓子、米菓類等）、アルコール飲料（日本酒、中国酒、ワイン、ウイスキー、焼酎、ウオッカ、ブランデー、ジン、ラム酒、ビール、清涼アルコール飲料、果実酒、リキュール等）、嗜好飲料（緑茶、紅茶、ウーロン茶、コーヒー、清涼飲料、乳酸飲料等）、調味料（しょうゆ、ソース、酢、みりん等）、缶詰・瓶詰め・袋詰め食品（牛飯、釜飯、赤飯、カレー、その他の各種調理済み食品）、半乾燥又は濃縮食品（レバーペースト、その他のスプレッド、そば・うどんの汁、濃縮スープ類）、乾燥食品（即席麺類、即席カレー、インスタントコーヒー、粉末ジュース、粉末スープ、即席味噌汁、調理済み食品、調理済み飲料、調理済みスー

ブ等)、冷凍食品(すき焼き、茶碗蒸し、うなぎかば焼き、ハンバーグステーキ、シュウマイ、餃子、各種スティック、フルーツカクテル等)、固形食品、液体食品(スープ等)、香辛料類等の農産・林産加工品、畜産加工品、水産加工品等が挙げられる。

本発明の食品又は飲料としては、サイトカイン類産生調節作用、一酸化窒素産生誘導作用、抗アレルギー作用等から選択される生理作用を有するフコイダン及び／又はその分解物が含有されており、その生理作用を発現するための必要量が含有されていれば特にその形状に限定はなく、タブレット状、顆粒状、カプセル状等の経口的に摂取可能な形状物も包含する。

フコイダン及び／又はその分解物の食品又は飲料における含有量は、その官能と生理活性の点から適宜選択すればよいが、例えば、食品100重量部当たり $10^{-9}$ 重量部以上、好ましくは $10^{-7}$ ~2重量部であり、例えば飲料100重量部当たり $10^{-9}$ 重量部以上、好ましくは $10^{-7}$ ~2重量部である。また、例えば、成人1日当たりフコイダン及び／又はその分解物が好ましくは0.01~2000mg/kgとなるように摂取すればよい。

なお、サイトカイン類産生調節作用、一酸化窒素産生誘導作用、抗アレルギー作用等から選択される生理作用を有するフコイダン及びその分解物は、当該生理作用と食物繊維機能を合わせ持つ健康食品素材として、食品又は飲料の製造素材として極めて有用である。

さらに本発明により、サイトカイン類産生調節作用、一酸化窒素産生誘導作用、抗アレルギー作用等から選択される生理作用を有するフコイダン及び／又はその分解物を有効成分として含有してなる生物用の飼料が提供される。

また本発明の一態様として、当該生理作用を有するフコイダン及び／又はその分解物を生物に投与する生物の飼育方法が提供される。

また本発明の一態様として、当該生理作用を有するフコイダン及び／又はその分解物を含有する生物飼育用剤が提供される。

これらの発明において、生物とは例えば養殖動物、ペット動物等であり、養殖動物としては家畜、実験動物、家禽、魚類、甲殻類又は貝類が例示される。

飼料としてはフコイダン及び／又はその分解物の生理作用に基づく体調改善用飼料が例示される。

生物飼育用剤としては浸漬用剤、飼料添加剤、飲料用添加剤が例示される。

これらの発明において、当該生理作用を有するフコイダン及び／又はその分解物は、生物の飼育効率、例えば生存率、肥育率、産卵率、産仔率、離乳率等を向上させる効果を有する。

フコイダン及び／又はその分解物を生物に投与する生物の飼育方法においては、当該生理作用を有するフコイダン及び／又はその分解物を通常、対象生物の体重1kg、1日当たり好ましくは0.01～2000mg投与すればよい。投与は、例えばフコイダン及び／又はその分解物を人工配合飼料の原料中に添加、混合するか、人工配合飼料の粉末原料と混合した後、その他の原料に添加、混合することにより行うことができる。また、かかるフコイダン及び／又はその分解物の投与量が達成され得るように、本発明の飼料を投与してもよい。

当該生理作用を有するフコイダン及び／又はその分解物の飼料中の含有量は特に限定はなく、目的に応じて使用すれば良いが、0.001～15重量%の割合が好ましい。

人工配合飼料としては、魚粉、カゼイン、イカミールなどの動物性原料、大豆粕、小麦粉、デンプン、飼料用酵母などの植物性原料、タラ肝油、イカ肝油、などの動物性油脂、大豆油、菜種油等の植物性油脂、ビタミン類、ミネラル類、アミノ酸、抗酸化剤等を原料とする人工配合飼料が挙げられる。また魚肉ミンチ等の魚類用飼料が挙げられる。

又、機能性オリゴ糖、例えばフラクトオリゴ糖、イソマルトオリゴ糖等、食物繊維、例えばポリデキストロース、難消化性デキストリン、 $\beta$ -1,3-グルカン等、プロポリス、糖アルコール、例えばマルチトール、パラニチット、エリス

リトール等、EPA、γ-リノレン酸、ヘム鉄、クロレラ、スピルリナ、ホワイトベリーエキス、難う触性素材、例えばポリフェノール等の機能性食品素材を本発明の飼料の原料として使用しても良い。なお本発明において飼料としては、飼料添加剤、飼料用栄養補助食も包含される。

本発明の飼料の製造方法に特に限定は無く、製造された飼料中にサイトカイン類産生調節作用、一酸化窒素産生誘導作用、抗アレルギー作用等から選択される生理作用を有するフコイダン及び／又はその分解物の有効量が含有されていればよい。

また当該生理作用を有するフコイダン及び／又はその分解物をプール、水槽、保持タンク又は飼育領域の水、海水等に直接添加し、対象生物を浸漬することにより、投与することもできる。この浸漬方法は対象生物の飼料摂取量が低下したときに特に有効である。

水又は海水中のフコイダン及び／又はその分解物の濃度は特に限定はなく、目的に応じて使用すれば良いが、0.00001～1重量%の割合が好ましい。

また当該生理作用を有するフコイダン及び／又はその分解物を含有する飲料を飼育用飲料として対象生物に摂取させても良い。

飲料中の当該生理作用を有するフコイダン及び／又はその分解物の濃度は特に限定はなく、目的に応じて使用すれば良いが、0.0001～1重量%の割合が好ましい。

当該生理作用を有するフコイダン及び／又はその分解物を有効成分とする生物飼育用剤、例えば浸漬用剤、飼料添加剤、飲料用添加剤はそれ自体公知の方法で作製すれば良い。

本発明が適用できる生物としては限定はないが、養殖動物としては、馬、牛、豚、羊、山羊、らくだ、ラマ等の家畜、マウス、ラット、モルモット、ウサギ等の実験動物、鶏、アヒル、七面鳥、駝鳥等の家禽、マダイ、イシダイ、ヒラメ、カレイ、ブリ、ハマチ、ヒラマサ、マグロ、シマアジ、アユ、サケ・マス類、ト

ラフグ、ウナギ、ドジョウ、ナマズ等の魚類、クルマエビ、ブラックタイガー、タイショウエビ、ガザミ等の甲殻類等、アワビ、サザエ、ホタテ貝、カキ等の貝類、ペット動物としてはイヌ、ネコ等が挙げられ、陸上・水中動物に広く適用できる。

サイトカイン類産生調節作用、一酸化窒素産生誘導作用、抗アレルギー作用等から選択される生理作用を有するフコイダン及び／又はその分解物を含有する飼料を摂取すること、又は当該フコイダン及び／又はその分解物の含有液に対象生物を浸漬することにより、家畜、実験動物、家禽、魚類、甲殻類、貝類、ペット動物等の体調、健康、生体の恒常性、新陳代謝等が顕著に改善され、本発明は生物の老化防止に極めて有用である。

さらに、サイトカイン類産生調節作用、一酸化窒素産生誘導作用、抗アレルギー作用等から選択される生理作用を有するフコイダン及び／又はその分解物は化粧料の有効成分として有用であり、本発明の一態様として、フコイダン及び／又はその分解物を有効成分とするサイトカイン類産生調節用化粧料、一酸化窒素産生誘導用化粧料、抗アレルギー用化粧料等が提供される。

これらの化粧料等に含有されるフコイダン及び／又はその分解物の含有量は通常、好ましくは0.0001～20重量%、より好ましくは0.001～5重量%である。

本発明の化粧料は経皮的、経口的使用に有効であり本発明により経皮投与、経口投与で有効な化粧料が提供される。特に抗アレルギー用化粧料はその抗アトピー作用により、アトピー性皮膚炎の治療、予防に有用な化粧料である。なお、その投与量又は適用量は、所望の効果が得られるように適宜調節すればよい。

本発明の化粧料は常法に従って製造することができ、サイトカイン類産生調節用化粧料、一酸化窒素産生誘導用化粧料、抗アレルギー用化粧料として、例えばローション類、乳液類、クリーム類、パック類、浴用剤、洗顔剤、浴用洗剤、毛髪剤、育毛剤又は洗髪剤を製造することができる。

本発明に使用するサイトカイン類産生調節作用、一酸化窒素産生誘導作用、抗アレルギー作用を有するフコイダン及び／又はその分解物はラットに対する経口投与において1 g / k gを経口単回投与しても死亡例は認められない。

#### 実施例

以下、実施例を挙げて、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらの記載に何ら限定されるものではない。なお、実施例における％は重量％を意味する。

#### 参考例 1

(1) ガゴメ昆布を充分乾燥後、乾燥物20 k gを自由粉碎機（奈良機械製作所製）により粉碎した。

水道水900リットルに塩化カルシウム二水和物（日本曹達社製）7.3 k gを溶解し、次にガゴメ昆布粉碎物20 k gを混合した。液温12℃から液温90℃となるまで水蒸気吹込みにより40分間昇温させ、次いでかくはん下90～95℃に1時間保温し、次いで冷却し、冷却物1100リットルを得た。

次いで固液分離装置（ウエストファリアセパレーター社製CNA型）を用い、冷却物の固液分離を行い、約900リットルの固液分離上清液を調製した。

固液分離上清液360リットルをダイセル社製FE10-FC-FUS0382（分画分子量3万）を用い、20リットルまで濃縮した。次いで水道水を20リットル加え、また20リットルまで濃縮するという操作を5回行い、脱塩処理を行い、ガゴメ昆布由来の抽出液25リットルを調製した。

該溶液1リットルを凍結乾燥し、ガゴメ昆布由来フコイダン乾燥物13 gを得た。

(2) 参考例1-(1)記載のフコイダン乾燥物7 gを、50 mMの塩化ナトリ



ウムと10%のエタノールを含む20mMのイミダゾール緩衝液(pH8.0)700mlに溶解し、遠心分離により不溶物を除去した。DEAE-セルロファインA-800カラム( $\phi$ 11.4cm $\times$ 48cm)を同緩衝液にて平衡化し、遠心分離上清をアプライ後、同緩衝液で洗い、塩化ナトリウムの50mMから1.95Mの濃度勾配により溶出させた(1フラクション:250ml)。フェノール硫酸法及びカルバゾール硫酸法にて、総糖量及びウロン酸含量を求め、溶出順にフラクション43~49、フラクション50~55、フラクション56~67の画分を得た。次に、これらの画分を電気透析により脱塩後凍結乾燥し、フラクション43~49よりI画分(340mg)、フラクション50~55よりII画分(870mg)、フラクション56~67よりIII画分(2.64g)をそれぞれ調製した。

第1図にガゴメ昆布由来フコイダンのDEAE-セルロファインA-800カラム溶出パターンを示す。第1図において縦軸はカルバゾール硫酸法での530nmの吸光度(図中黒丸)、フェノール硫酸法での480nmの吸光度(図中白丸)、及び電導度(mS/cm:図中白四角)、横軸はフラクション番号を示す。

## 参考例2

(1) アルテロモナス sp. SN-1009 (FERM BP-5747) を、グルコース 0.25%、ペプトン 1.0%、酵母エキス 0.05%を含む人工海水(ジャマリンラボラトリー社製) pH8.2からなる培地600mlを分注して殺菌した(120℃、20分間)2リットルの三角フラスコに接種し、25℃で26時間培養して種培養液とした。ペプトン 1.0%、酵母エキス 0.02%、下記参考例2-(2)に記載の硫酸化多糖 0.2%、及び消泡剤(信越化学工業社製KM70) 0.01%を含む人工海水 pH8.0からなる培地20リットルを30リットル容のジャーファメンターに入れて120℃、

20分間殺菌した。冷却後、上記の種培養液600mlを接種し、24℃で24時間、毎分10リットルの通気量と毎分250回転のかくはん速度の条件で培養した。培養終了後、培養液を遠心分離して菌体及び培養上清を得た。得られた培養上清を、排除分子量1万のホロファイバーを装着させた限外ろ過機により濃縮後85%飽和硫酸塩析し、生じた沈殿を遠心分離により集め、10分の1濃度の人工海水を含む20mMのトリス-塩酸緩衝液(pH8.2)に対して充分透析し、600mlの硫酸化多糖に選択的に作用するエンド型硫酸化多糖分解酵素(F-フコイダン特異的分解酵素)液を調製した。

(2) 乾燥したガゴメ昆布2Kgを直径1mmのスクリーンを装着させたカッターミル(増幸産業社製)により粉碎し、得られた昆布のチップを20リットルの80%エタノール中に懸濁し、25℃で3時間かくはんし、ろ紙でろ過後、残渣を充分洗浄した。得られた残渣を、95℃に加温した40リットルの50mMの塩化ナトリウムを含む20mMリン酸ナトリウム緩衝液pH6.5に懸濁し、時々かくはんしながら95℃で2時間処理し、硫酸化多糖を抽出した。

抽出液中の懸濁物を、ろ過し、ろ液を調製した後、ろ過残渣を3.5リットルの100mM塩化ナトリウムにより洗浄し、更にろ液を得た。

両ろ液を合わせた後、30℃まで温度を下げ、3000Uのアルギン酸リアーゼK(ナガセ生化学工業社製)を添加後、エタノールを4リットル加え25℃で24時間かくはんした。次に遠心分離を行い、得られた上清を排除分子量10万のホロファイバーを備えた限外ろ過器により4リットルに濃縮し、更に、10%のエタノールを含む100mMの塩化ナトリウムにより、着色性物質がろ過されなくなるまで限外ろ過を続けた。

非ろ過液中に生じた沈殿は遠心分離により除去し、この上清を5℃まで温度を下げ、0.5N塩酸によりpHを2.0とした後、生じたタンパク質等の沈殿を遠心分離により除去し、得られた上清を速やかに1N水酸化ナトリウムによりp

Hを8.0とした。

次に、排除分子量10万のホロファイバーを装着させた限外ろ過器により限外ろ過を行い、20mM塩化ナトリウムpH8.0により完全に溶媒置換後、再度pHを8.0として遠心分離後、凍結乾燥を行い、約95gの硫酸化多糖を調製した。

(3) 乾燥したガゴメ昆布2Kgを直径1mmのスクリーンを装着させたカッターミルにより粉碎し、得られた昆布のチップを20リットルの80%エタノール中に懸濁し、25℃で3時間かくはんし、ろ紙でろ過後、残渣を充分洗浄した。得られた残渣を、30mlの上記参考例2-(1)で調製したエンド型硫酸化多糖分解酵素、10%のエタノール、100mMの塩化ナトリウム、50mMの塩化カルシウム、及び50mMのイミダゾールを含む20リットルの緩衝液(pH8.2)に懸濁し、25℃で48時間かくはんした。この懸濁液を網目の直径32μmのステンレス金網でろ過し、残渣を50mMの塩化カルシウムを含む10%のエタノールで洗浄した。更にその残渣を10リットルの50mM塩化カルシウムを含む10%のエタノール中に懸濁し、3時間かくはん後、ステンレス金網でろ過、洗浄した。更にその残渣を同条件で懸濁後、16時間かくはんし、直径32μmのステンレス金網でろ過、洗浄した。

こうして得られたろ液及び洗浄液を集め、排除分子量3000のホロファイバーを装着させた限外ろ過機により限外ろ過し、ろ過液と非ろ過液に分離した。

このろ過液をロータリーエバポレーターで約3リットルに濃縮後、遠心分離して上清を得た。得られた上清を排除分子量300の膜を装着させた電気透析器により脱塩し、この溶液に0.1Mとなるように酢酸カルシウムを添加し、生じた沈殿を遠心分離により除去した。この上清をあらかじめ50mMの酢酸カルシウムにより平衡化させたDEAE-セルロファイン(樹脂量4リットル)にかけ、50mMの酢酸カルシウム及び50mMの塩化ナトリウムで充分洗浄後、50m

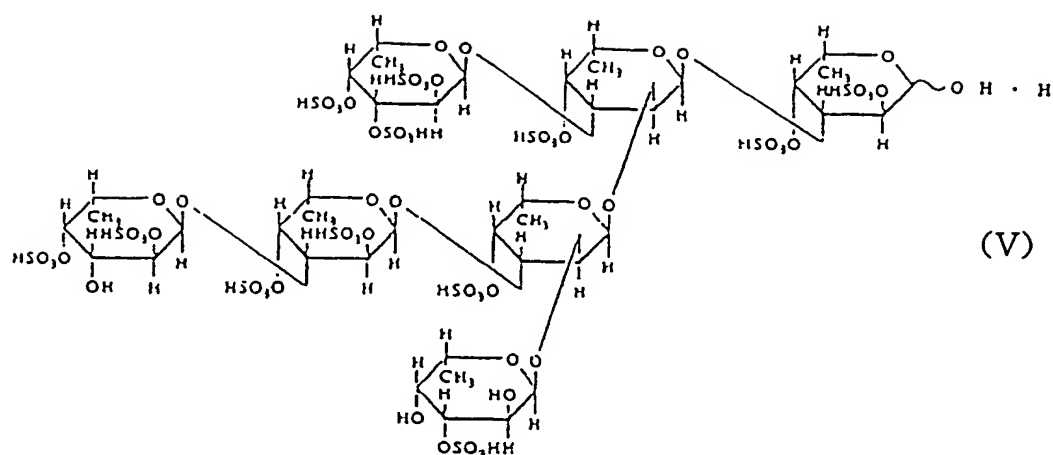
M~800mMの塩化ナトリウムの濃度勾配により溶出させた。この時の分取量は1本当たり500mlで行った。分取した画分をセルロースアセテート膜電気泳動法〔アナリティカル バイオケミストリー (Analytical Biochemistry)、第37巻、第197~202頁(1970)〕により分析したところ塩化ナトリウム濃度が約0.4Mで溶出される硫酸化糖(フラクションナンバー63付近)が均一であった。

そこで、まずフラクションナンバー63の液を150mlに濃縮後、濃度が4Mとなるように塩化ナトリウムを添加し、あらかじめ4Mの塩化ナトリウムにより平衡化したPhenyl-セルロファイン(樹脂量200ml)にかけ、4Mの塩化ナトリウムにより充分洗浄した。非吸着性の硫酸化糖画分を集め、排除分子量300の膜を装着させた電気透析器により脱塩し、脱塩液505mlを得た。

得られた脱塩液のうち40mlを10%のエタノールを含む0.2Mの塩化ナトリウムによって平衡化させたセルロファインGCL-90のカラム(4.1cm×87cm)にかけて、ゲルろ過を行った。分取は1フラクション当たり9.2mlで行った。

全フラクションに対して総糖量の分析をフェノール硫酸法〔アナリティカル ケミストリー (Analytical Chemistry)、第28巻、第350頁(1956)〕により行った。

この結果、硫酸化糖は1つのピークを形成したので、そのピークの中央部分、フラクションナンバー63~70を集め、排除分子量300の膜を装着させた電気透析器により脱塩後、凍結乾燥し、112mgの下記式Vで表される化合物の乾燥品を得た。



### 参考例 3

(1) 乾燥ガゴメ昆布 2 Kg を穴径 1 mm のスクリーンを装着したカッターミル (増幸産業社製) により破碎し、20 リットルの 80 % エタノール中で 25℃、3 時間攪拌後ろ過、洗浄した。得られた残渣を 50 mM の塩化カルシウム、100 mM の塩化ナトリウム、10 % のエタノール、及び参考例 2 - (1) で調製したアルテロモナス *sp.* SN-1009 (FERM BP-5747) エンド型硫酸化多糖分解酵素 (F-フコイダン特異的分解酵素) を 1 U 含む 20 リットルの 30 mM イミダゾール緩衝液 (pH 8.2) に懸濁し、25℃で 2 日攪拌し、次いで穴径 32  $\mu\text{m}$  のステンレス金網でろ過し、洗浄した。得られた残渣を 100 mM の塩化ナトリウム、10 % のエタノール、及び 4 g のアルギン酸リアーゼ (ナガセ生化学工業製) を含む 40 リットルのリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.6) に懸濁し、25℃、4 日攪拌後、遠心分離し上清を得た。得られた上清中に含まれるアルギン酸の低分子化物を除去するため、排除分子量 10 万のホロファイバーを装着した限外ろ過機により 2 リットルに濃縮後、10 % のエタノールを含む 100 mM の塩化ナトリウムで溶液交換した。この溶液に等量の 40

0 mM酢酸カルシウムを添加攪拌後、遠心分離し、得られた上清を氷冷しながら、1 Nの塩酸でpH 2とした。生じた沈殿を遠心分離により除去し、得られた上清を1 Nの水酸化ナトリウムによりpH 8.0とした。この溶液を限外ろ過により1 リットルに濃縮後、100 mMの塩化ナトリウムで溶液交換した。この時生じた沈殿は遠心分離により除去した。得られた上清中の疎水性物質を除去するため、上清に1 Mとなるように塩化ナトリウムを加えて、1 Mの塩化ナトリウムで平衡化した3 リットルのフェニルセルロファインカラム（生化学工業製）にかけ、素通り画分を集めた。この画分を限外ろ過機により濃縮後、20 mMの塩化ナトリウムで溶液交換し、凍結乾燥した。凍結乾燥物の重量は29.3 gであった。

(2) 上記の凍結乾燥物15 gを400 mMの塩化ナトリウム及び国際公開第97/26896号パンフレット記載のフラボバクテリウム *sp.* SA-0082 (FERM BP-5402) を培養し、参考例2-(1)と同様にして該培養物から得られたエンド型硫酸化多糖分解酵素（U-フコイダン特異的分解酵素）を9 U含む1.5 リットルの50 mMトリス塩酸緩衝液に溶解し、25℃で6日反応後、エバポレーターで約300 mlに濃縮した。濃縮液を排除分子量3500の透析チューブに入れて徹底的に透析し、透析チューブ内に残った液を、50 mMの塩化ナトリウムで平衡化した4 リットルのDEAE-セルロファインA-800にかけ、50 mM塩化ナトリウムで充分洗浄後、50～650 mMの塩化ナトリウムの濃度勾配による溶出を行った。更に同カラムを650 mMの塩化ナトリウムで充分溶出させた。溶出画分のうち650 mMの塩化ナトリウムで溶出した画分を硫酸化フコガラクトン画分として集め、排除分子量10万の限外ろ過機により濃縮後、10 mMの塩化ナトリウムで溶液を置換し、凍結乾燥して硫酸化フコガラクトンの凍結乾燥物を0.85 g得た。得られた硫酸化フコガラクトン（G-フコイダン）は、構成糖としてガラクトースとフコースを含有し、

そのモル比は、約 2 : 1 であった。

#### 参考例 4

市販のワカメ メカブの乾燥物 1 K g を穴の径が 1 m m のスクリーンを装着させたカッターミルにより破碎後、1 0 リットルの 8 0 % エタノール中に懸濁し、3 時間攪拌後、ろ紙によりろ過し、残渣を得た。残渣を 5 0 m M の塩化ナトリウムを含む 4 0 m M のリン酸緩衝液 (p H 6 . 5 ) 2 0 リットルに懸濁し 9 5 °C で 2 時間処理した。処理液を 3 7 °C まで冷却後、1 0 % となるようにエタノールを添加し、市販のアルギン酸リアーゼ K (ナガセ生化学工業社製) を 1 2 0 0 0 U 添加後、室温で 2 4 時間攪拌した。得られた処理液を遠心分離し、その上清を排除分子量 1 0 万のホロファイバーを装着させた限外ろ過機により 2 リットルに濃縮後、生じた沈殿を遠心分離により除去した。得られた上清を 5 °C に冷却後 0 . 5 N の塩酸を添加して p H を 2 . 0 とした後 3 0 分間攪拌し、生じた沈殿を遠心分離により除去した。上清の p H を 0 . 5 N の水酸化ナトリウムにより 8 . 0 とし、限外ろ過により溶液を 2 0 m M の塩化ナトリウムに置換した。溶液の p H を 8 . 0 に調整後、遠心分離して得られた上清を凍結乾燥し、9 0 . 5 g のワカメ メカブ由来フコイタンを得た。

#### 参考例 5

粉碎したヒバマタ (*Fucus vesiculosus*) の乾燥物 1 K g を、1 0 リットルの 8 0 % エタノール中に懸濁し、3 時間攪拌後、ろ紙によりろ過し、残渣を得た。残渣を 1 0 0 m M の塩化ナトリウムを含む 3 0 m M のリン酸緩衝液 (p H 6 . 0 ) 3 0 リットルに懸濁し 9 5 °C で 2 時間処理した。処理液を 3 7 °C まで冷却後、1 0 0 g の活性炭を添加し 3 0 分間攪拌した。市販のアルギン酸リアーゼ K を 3 0 0 0 U 添加後、1 0 % となるようにエタノールを添加し室温で 2 4 時間攪拌した。得られた処理液を遠心分離し、その上清を排除分子量 1 0 万のホロファイバ

ーを装着させた限外ろ過機により2リットルに濃縮後、生じた沈殿を遠心分離により除去した。この上清に抽出液を加えながら限外ろ過し、色素を除去した。得られた非ろ過液を5℃に冷却後0.5Nの塩酸を添加してpHを2.0とした後30分間攪拌し、生じた沈殿を遠心分離により除去した。上清のpHを0.5Nの水酸化ナトリウムにより8.0とし、限外ろ過により溶液を20mMの塩化ナトリウムに置換した。溶液のpHを8.0に調整後、遠心分離して得られた上清を凍結乾燥し、71gのヒバマタ由来フコイダンを得た。

#### 参考例6

参考例1-(1)記載の方法で調製したガゴメ昆布由来フコイダン2gを100mlの水に溶解し、そのpHをクエン酸にてpH3に調整後、100℃で3時間処理し、当該フコイダンの酸分解物を調製した。この酸分解物をセルロフィンGCL-300、又はセルロフィンGCL-25によるゲルろ過で分子量分画し、分子量25000超(A画分)、25000~10000超(B画分)、10000~5000超(C画分)、5000~2000超(D画分)、2000~500超(E画分)、500以下(F画分)に分画した。更にこれらの画分及び酸分解物をそれぞれ脱塩後凍結乾燥を行い、酸分解物の各分画物及び酸分解物を調製した。

#### 参考例7

マナマコを5kg解体し、内臓を除去し、体壁を集めた。体壁湿重量200g当り500mlのアセトンを加え、ホモジナイザーで処理後ろ過し、残渣をこれ以上着色物質がなくなるまでアセトンで洗浄した。この残渣を吸引乾燥し、140gの乾燥物を得た。この乾燥物に0.4Mの食塩水2.8リットルを加え、100℃で1時間処理後、ろ過し、残渣を0.4Mの食塩水で充分洗浄し、抽出液3.7リットルを得た。この抽出液に5%のセチルピリジニウムクロリドを沈殿



が生じなくなるまで加え、生じた沈殿を遠心分離で集めた。この沈殿を 0.4 M の食塩水に懸濁後再度遠心分離し、得られた沈殿に 1 リットルの 4 M 食塩水を添加し、ホモジナイザーで処理後、かくはんしながら 4 リットルのエタノールを添加し、1 時間かくはん後、ろ過し、沈殿を得た。この沈殿に対して、80 % エタノールに懸濁後ろ過という工程を上清の 260 nm の吸光度が 0 になるまで繰り返した。得られた沈殿を 2 リットルの 2 M 食塩水に懸濁し、不溶物を遠心分離により除去した。上清を排除分子量 3 万の膜を備えた限外ろ過装置により限外ろ過し、完全に脱塩後、凍結乾燥し 3.7 g のナマコ由来フコイタンを得た。

#### 参考例 8

市販の塩蔵オキナワモズク 625 g を 4375 ml の 30 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) に懸濁し、ホモジナイザーにより 8000 回転/分、5 分処理後、95 °C、1 時間処理し、遠心分離により上清を得た。得られた上清に 10 g の活性炭を添加後 30 分間攪拌し、遠心分離により上清を得た。得られた上清を排除分子量 10 万のホロファイバーを装着させた限外ろ過機により 2 リットルに濃縮後、20 mM の塩化ナトリウムで溶液置換し、凍結乾燥して 10.9 g のオキナワモズク由来のフコイタン画分の乾燥物を得た。

#### 実施例 1

10 % ウシ胎児血清 (ギブコ社製) 含有、フェノールレッド不含、2 mM L-グルタミン (ライフテックオリエンタル社製、25030-149) 含有ダルベッコ改良イーグル培地 (バイオウィタカー社製、12-917F) に RAW 264.7 細胞 (ATCC TIB 71) を  $6 \times 10^5$  cells/ml になるように懸濁し、48 穴マイクロタイタープレートのウェルに 500  $\mu$ l ずつ加えて 5 % 炭酸ガス存在下、37 °C で 12 時間若しくは 24 時間培養した。各ウェルに後述する試料の各水溶液を添加して前記規定時間培養した後、一酸化窒素 (N

○) が培地中で酸化されることによって生ずる $\text{NO}_2^-$ 濃度の測定を行った。試料として用いた、参考例1-(2)記載のガゴメ昆布由来フコイダンのI画分、II画分、及びIII画分、参考例2-(3)記載の式Vで表される化合物(以下、7-12SFd-Fと称す)は、最終濃度が、1、10、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように添加した。また、対照は試料と同量の滅菌蒸留水を添加した。なお、陽性対照としては、リポポリサッカライド(LPS、シグマ社製)を最終濃度が、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように添加した。

上記培養後、100 $\mu\text{l}$ の培地に100 $\mu\text{l}$ の4%グリース試薬(シグマ社製、G4410)を加え、室温で15分間放置した後、540nmにおける吸光度を測定した。上記培地に予め既知の濃度で溶解させた $\text{NaNO}_2$ で作製した検量線から培地中の $\text{NO}_2^-$ 濃度を計算した。測定はすべて3連で行った。

この結果、7-12SFd-F、ガゴメ昆布由来フコイダンのI画分、II画分、及びIII画分はどれもNO産生誘導を促進し、免疫賦活作用があることが明らかになった。その結果を第2図～第5図に示す。すなわち、第2図は7-12SFd-F、第3図はI画分、第4図はII画分、第5図はIII画分を添加して培養した時の培地中の $\text{NO}_2^-$ 濃度を示す図である。また第6図は陽性対照のLPSを添加して培養した時の培地中の $\text{NO}_2^-$ 濃度を示す図である。第2図～第6図において横軸は培養条件を、縦軸は $\text{NO}_2^-$ 濃度( $\mu\text{M}$ )を示す。

これらの結果より、ガゴメ昆布由来フコイダンのI画分、II画分、III画分、及び7-12SFd-Fには、NO産生誘導作用、及び該作用を介した免疫賦活効果があることが明らかになった。

なお、各参考例に記載のその他のフコイダン及びその分解物も同様のNO産生誘導作用を示した。

また、 $\text{NO}_2^-$ 濃度を測定した培養液と同じ培養液中のIFN- $\gamma$ 量をELISAキット(Genzyme社)を用いて測定した。しかし、この系においてはガゴメ昆布由来フコイダンのI画分、II画分、III画分、7-12SFd-F、及びそ

の他の各参考例に記載のフコイダン及びその分解物に I F N -  $\gamma$  の産生誘導は見られなかった。

## 実施例 2

### (1) 非刺激リンパ球からの I F N - $\gamma$ 産生誘導作用

ICR マウス（雌、7 週齢、体重約 25 g）は日本 S L C より購入し、1 週間の予備飼育の後、実験に用いた。マウスより脾臓を摘出し、細かく粉碎して 10 % 牛胎児血清（ハイクローン社）を含んだ R P M I - 1 6 4 0 培地（ギブコ社）に懸濁して単細胞液を得た。接着性細胞をプラスチックシャーレに接着させて除き、非接着性細胞を脾臓リンパ球として用いた。脾臓リンパ球は 10 % 牛胎児血清を含んだ R P M I - 1 6 4 0 培地に懸濁して  $2 \times 10^6$  c e l l s / m l に調整し、180  $\mu$  l / ウェルで 96 穴マイクロタイタープレートに播種した。各試料は蒸留水に溶解して 100 m g / m l の濃度に調整し、表示量の 10 倍濃度に培地で希釈した。対照は試料と同量の培地を添加し、該対照群以外の各ウェルに各濃度（10 ~ 500  $\mu$  g / m l）の参考例に記載の各フコイダン、ガゴメ昆布フコイダンの I 画分、I I 画分、I I I 画分、7 - 1 2 S F d - F または 100  $\mu$  g / m l のコンカナバリン A（C o n A ; ナカライテスク社）溶液を 20  $\mu$  g / m l 添加し 37 °C、5 % 炭酸ガス培養器で 2 日間または 4 日間培養した。培養後、培養上清を回収し、I F N -  $\gamma$  量を ELISA キット（Genzyme 社）を用いて測定した。

その結果、参考例に記載の各フコイダン、ガゴメ昆布由来フコイダンの I 画分、I I 画分、I I I 画分、7 - 1 2 S F d - F には 500  $\mu$  g / m l 以下の用量において非刺激リンパ球からの I F N -  $\gamma$  産生誘導作用は認められなかった。一方、C o n A を添加した細胞では強い I F N -  $\gamma$  の産生誘導が認められた。

### (2) アロ抗原刺激下における I F N - $\gamma$ 産生誘導作用

BALB/cマウス（雌、6週齢、体重約20g）、C57BL/6 マウス（雌、6週齢、体重約20g）は日本S L Cより購入し、1週間の予備飼育の後、実験に用いた。H-2 のハプロタイプの異なったマウス（BALB/c ; H-2d、C57BL/6 ; H-2b）より脾臓を摘出し、上記の方法により脾臓リンパ球を得た。各細胞浮遊液の細胞濃度を $2 \times 10^6$  cells/mlに調整し、100  $\mu$ lづつを96穴マイクロタイタープレートに播種した。該対照群以外の各ウェルに各濃度（10～500  $\mu$ g/ml）の参考例に記載の各フコイダン、ガゴメ昆布由来フコイダンのI画分、II画分、III画分、7-12 S F d-Fまたは10  $\mu$ g/mlのCon Aを実施例2-(1)と同様に添加した。また、対照は試料と同量の培地を添加した。これらを37°C、5%炭酸ガス培養器で4日間培養した。培養後、培養上清を回収し、IFN- $\gamma$ 量をELISA キットを用いて測定した。

その結果、参考例に記載の各フコイダン、ガゴメ昆布由来フコイダンのI画分、II画分、III画分、7-12 S F d-Fには500  $\mu$ g/ml以下の用量においてアロ抗原刺激状態のリンパ球に対するIFN- $\gamma$ 産生誘導作用は認められなかった。一方、Con Aを添加した細胞では強いIFN- $\gamma$ の誘導が認められた。

### （3）感作リンパ球の抗原刺激下におけるIFN- $\gamma$ 産生誘導作用

C57BL/6 マウス（雌、6週齢、体重約20g）は日本S L Cより購入し、1週間の予備飼育の後、実験に用いた。マウスの腹腔内に $1 \times 10^6$  cellsのMeth-Aマウス肉腫細胞を接種して免疫した。腫瘍接種14日後に脾臓を摘出し、上記の方法により脾臓リンパ球を得た。細胞浮遊液の細胞濃度を $2 \times 10^6$  cells/mlに調整し、100  $\mu$ lづつを96穴マイクロタイタープレートに播種した。刺激細胞の調製のため、RPMI-1640培地に懸濁して $2 \times 10^6$  cells/mlに調整したMeth-Aマウス肉腫細胞にマイトマイシンC（協和発酵社製）を50  $\mu$ g/mlの濃度で添加して37°Cで30分間処理し、2回洗浄後

、10%牛胎児血清を含んだRPMI-1640培地に懸濁して $2 \times 10^6$  cells/mlに調整した。調製した刺激細胞を100  $\mu$ l/ウェルで脾臓リンパ球を加えたプレートの各ウェルに重層し、37℃、5%炭酸ガス培養器で4日間培養した。試料として用いた、ガゴメ昆布由来フコイダンは1~100  $\mu$ g/mlとなるよう、ガゴメ昆布由来フコイダンのI画分、II画分、III画分、7-12SFd-Fは各10~500  $\mu$ g/mlとなるように、また陽性対照にはConAを10  $\mu$ g/mlとなるように、実施例2-(1)と同様に調製、添加し培養した。また、対照は試料と同量の培地を添加した。培養後、培養上清を回収し、IFN- $\gamma$ 量をELISAキットを用いて測定した。同培養上清においてIL-12量をELISAキット(ENDOGEN社)を用いて測定した。

その結果を第7図、第8図に示す。すなわち第7図はフコイダン及びその分解物のIFN- $\gamma$ 産生誘導作用を示す図であり、図中縦軸はIFN- $\gamma$ 産生量(pg/ml)、横軸は各試料、及び添加量( $\mu$ g/ml)を示す。

また第8図はフコイダン及びその分解物のIL-12産生誘導作用を示す図であり、図中縦軸はIL-12産生量(pg/ml)、横軸は各試料、及び添加量( $\mu$ g/ml)を示す。

第7図、第8図に示すように、感作リンパ球の抗原刺激下において、ガゴメ昆布由来フコイダンは1~100  $\mu$ g/mlの用量において、I画分、II画分、III画分、及び7-12SFd-Fは10~500  $\mu$ g/mlの用量において用量依存的なIFN- $\gamma$ 、及びIL-12産生の増強作用を示した。またその他の各参考例に記載のフコイダンおよびその分解物も同様の作用を示した。

### 実施例3

C57BL/6 マウス(雌、7週齢、体重約20g)は日本SLCより購入し、1週間の予備飼育の後、実験に用いた。マウスより脾臓を摘出し、細かく粉碎して10%牛胎児血清(ハイクローン社)を含んだRPMI-1640培地(バイオウ

イッタカー社)に懸濁して単細胞液を得た。脾臓リンパ球は10%牛胎児血清を含んだRPMI-1640培地に懸濁して $3 \times 10^6$  cells/mlに調整し、T25フラスコ(イワキ社)に10ml加えた。フラスコは同じものを2つずつ用意し、一方には培地のみを、他方にはさらにガゴメ昆布由来フコイタンを $10 \mu\text{g/ml}$ となるように添加し、 $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ 存在下で培養した。

培養開始より10日後に細胞を回収し、所定の濃度になるように10%牛胎児血清を含んだRPMI-1640培地で希釈し、96穴丸底マイクロプレートに $100 \mu\text{l}$ ずつ分注した。

細胞の細胞傷害活性は、 $^{51}\text{Cr}$ でラベルしたEL4胸腺腫瘍細胞(以下、EL4細胞という)をターゲットとし、培養上清中に遊離してくる $\gamma$ 線量を測定した。すなわち、EL4細胞にChromium-51 Radionuclide(ニューイングランドニュークリア社) $1850 \text{ kBq}$ を加え $37^\circ\text{C}$ で一時間培養し、遠心操作にてRPMI-1640培地で3回洗浄した。10%牛胎児血清を含んだRPMI-1640培地に該細胞を懸濁して $1 \times 10^5$  cells/mlに調整した。これを上述の96穴丸底マイクロプレートに $100 \mu\text{l}$ ずつ分注し、 $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ 存在下で5時間培養し、上清 $100 \mu\text{l}$ を採取後、 $\gamma$ シンチレーションカウンターにて遊離した $\gamma$ 線量を測定した。細胞傷害活性は次のように算出した。

$$\text{細胞傷害活性(\%)} = \left[ (\text{実験値} - \text{対照値}) / (\text{総放射活性値} - \text{対照値}) \right] \times 100$$

ここで、総放射活性値は、培養脾細胞の代わりに0.1%Triton-X $100 \mu\text{l}$ を用いた場合の $\gamma$ 線量を示す。また、対照値は培養脾細胞の代わりに培地 $100 \mu\text{l}$ を用いた場合の $\gamma$ 線量を、実験値は培養脾細胞を用いた場合の $\gamma$ 線量を示す。

その結果を第9図に示す。すなわち第9図はガゴメ昆布由来フコイタンのマウス脾臓リンパ球の細胞傷害性免疫増強作用を示す図であり、縦軸は細胞傷害活性

(%)、横軸は対照のエフェクター細胞、及び参考例 1 記載のガゴメ昆布由来フコイタンを  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  となるように添加して培養して得られたエフェクター細胞 (E) とターゲット細胞 (T) との比 (E/T ratio) を示す。棒グラフは各群 5 匹の平均値と標準誤差を示す。

第 9 図に示すように、マウスの培養脾細胞 (エフェクター細胞) は、EL 4 細胞 (ターゲット細胞) に対して細胞傷害活性を示した (対照)。フコイタンを  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  となるように加えて培養した細胞では、EL 4 細胞に対する細胞傷害活性が増強されており、フコイタン添加群では低いエフェクター細胞とターゲット細胞との比にも拘らず、高い細胞傷害活性を示し、細胞傷害性免疫がフコイタンにより増強された。

また参考例に記載の他の各フコイタン、その分解物、I 画分、II 画分、III 画分、及び 7-12SFd-F も同様の活性を示した。

#### 実施例 4

##### (1) 非刺激リンパ球からの IFN- $\gamma$ 産生誘導作用

C57BL/6 マウス (雌、6 週齢、体重約  $20 \text{ g}$ ) は日本 SLC より購入し、1 週間の予備飼育の後、実験に用いた。前記の方法により調製した脾臓リンパ球を播種したプレートの各ウェルに  $10 \sim 500 \mu\text{g}/\text{ml}$  となるよう参考例 3-(2) で調製した G-フコイタンを添加し、 $37^\circ\text{C}$ 、5%炭酸ガス培養器で 4 日間培養した。培養後、培養上清を回収し、IFN- $\gamma$  量を ELISA キットを用いて測定した。

その結果、検討した用量において G-フコイタンによる IFN- $\gamma$  産生誘導作用は認められなかった。

##### (2) 感作リンパ球の抗原刺激下における IFN- $\gamma$ 産生誘導作用

C57BL/6 マウス (雌、6 週齢、体重約  $20 \text{ g}$ ) は日本 SLC より購入し、1 週

間の予備飼育の後、実験に用いた。試料として参考例 3 - (2) で調製した G - フコイダンは蒸留水に溶解して  $100 \text{ mg/ml}$  に調製し、表示量の 10 倍濃度に培地で希釈した。前記の方法により調製した脾臓リンパ球、及び Meth-A マウス肉腫細胞を播種したプレートの各ウェルに最終濃度が  $10 \sim 500 \mu\text{g/ml}$  となるよう調製した G - フコイダンを添加して  $37^\circ\text{C}$ 、5%炭酸ガス培養器で 4 日間培養した。なお、対照は試料と同量の培地を添加し、培養した。培養後、培養上清を回収し、IFN- $\gamma$  量、及び IL-12 量を ELISA キットを用いて測定した。

その結果を第 10 図、第 11 図に示す。すなわち第 10 図は G - フコイダンの IFN- $\gamma$  産生誘導作用を示す図であり、図中縦軸は IFN- $\gamma$  産生量 ( $\text{pg/ml}$ )、横軸は試料、及び添加量 ( $\mu\text{g/ml}$ ) を示す。また、第 11 図は G - フコイダンの IL-12 産生誘導作用を示す図であり、図中縦軸は IL-12 産生量 ( $\text{pg/ml}$ )、横軸は試料、及び添加量 ( $\mu\text{g/ml}$ ) を示す。第 10 図、第 11 図に示すように、感作リンパ球の抗原刺激下において、G - フコイダンは  $10 \sim 500 \mu\text{g/ml}$  の用量において用量依存的な IFN- $\gamma$  産生の増強作用が認められた。IL-12 についても  $500 \mu\text{g/ml}$  の用量において顕著な産生増強作用が認められた。

## 実施例 5

ガゴメ昆布由来フコイダンの IFN- $\gamma$  産生誘導作用に対する抗 IL-12 抗体及び抗副刺激レセプター (CD28、CD40) 抗体の作用

前記の方法により調製した C57BL/6 マウス由来脾臓リンパ球及び Meth-A マウス肉腫細胞を混合して 96 穴マイクロタイタープレートに播種し、全てのウェルに終濃度  $100 \mu\text{g/ml}$  の参考例 1 - (1) で調製したガゴメ昆布由来フコイダンを添加した。さらに対照以外のウェルに終濃度  $1 \mu\text{g/ml}$  の抗 IL-12 抗体 (R & D 社)、又は終濃度  $10 \mu\text{g/ml}$  の抗 CD28 抗体、若しくは抗 CD40



抗体を添加して 37℃、5%炭酸ガス培養器で4日間培養した。培養後、培養上清を回収し、IFN- $\gamma$ 量、及びIL-12量をELISAにより測定した。その結果を第12図に示す。すなわち第12図はフコイダンのIFN- $\gamma$ 又はIL-12産生誘導作用に対する各種抗体の作用を示す図であり、図中左縦軸はIFN- $\gamma$ 産生量(pg/ml)、右縦軸はIL-12産生量(pg/ml)、横軸は用いた各抗体を示す。

第12図に示すように、抗原提示反応時のガゴメ昆布由来フコイダンによるIL-12の産生誘導は抗IL-12抗体、抗CD28抗体、又は抗CD40抗体により完全に抑制された。一方、感作リンパ球からのIFN- $\gamma$ 産生誘導は抗IL-12抗体により約50%が抑制され、抗CD28抗体、又は抗CD40抗体により完全に抑制された。

## 実施例 6

### 各種フコイダンのIFN- $\gamma$ 産生誘導作用の比較

C57BL/6 マウスにMeth-Aマウス肉腫細胞を接種して免疫し、接種から24日後に脾臓を摘出した。前記の方法により調製したC57BL/6 マウス由来脾臓リンパ球、及びMeth-Aマウス肉腫細胞を混合して96穴マイクロタイタープレートに播種した。試料として、参考例1で調製したガゴメ昆布由来フコイダン、参考例8で調製したオキナワモズク由来フコイダン、参考例5で調製したヒバマタ由来フコイダン、及び参考例4で調製したワカメメカブ由来フコイダンを用い、各フコイダンの最終濃度が10~500  $\mu$ g/mlとなるように実施例2-(1)と同様に調製し、添加して37℃、5%炭酸ガス培養器で4日間培養した。なお、対照は試料と同量の培地を添加し、培養した。培養後、培養上清を回収し、IFN- $\gamma$ 量をELISAキットを用いて測定した。

その結果を第13図に示す。すなわち第13図は各フコイダンのIFN- $\gamma$ 産生誘導作用を示す図であり、図中縦軸はIFN- $\gamma$ 産生量(pg/ml)、横軸

は各試料、及び添加量 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を示す。

第13図に示すように、感作リンパ球の抗原刺激下におけるIFN- $\gamma$ 産生誘導能に関して、カゴメ昆布とヒバマタ由来フコイダンとは同等、オキナワモズク、ワカメ、メカブはそれに比べ弱いIFN- $\gamma$ 産生誘導作用が認められた。

#### 実施例7

1群4または5匹の5週令のウィスター系雄性ラット（日本S L C社）に、卵白アルブミン（シグマ社）の0.01%生理食塩水溶液100 $\mu\text{l}$ 及びアラム（商品名イムジェクト アラム（Imject Alum）；ピアス社製）100 $\mu\text{l}$ を腹腔内投与して感作し、その14日後に腹大静脈より血液を採取した。

採取した血液は遠心分離（2000rpm, 5分）後、血漿を分離し、ラットを用いた受身皮膚アナフィラキシー（PCA）反応で抗原特異的IgE量を測定した。すなわち血漿の倍々希釈系列を2倍から64倍まで、生理食塩水を用いて作製し、毛刈りした7週令のウィスター系雄性ラットの背部の皮内に0.1mlずつ注射した。皮内注射の48時間後、0.05%卵白アルブミン及び0.5%エバンスブルー（ナカライテスク社製）の混液1mlを尾静脈より注射した。尾静脈注射30分後、ラットを断頭、放血死させ、背部に現れた青色スポットを観察し、直径5mm以上のスポットを陽性とし、最高希釈倍数をIgE力価として表した。

参考例1-（1）で調製したカゴメ昆布由来フコイダンの投与群は抗原感作日7日前から採血日まで0.1%または1%のカゴメ昆布由来フコイダンを給水瓶に入れ、自由摂取させた。また対照群では水道水を同様に与えた。その結果、卵白アルブミン感作による抗原特異的IgE量の上昇は1%カゴメ昆布由来フコイダンの飲水摂取により著明に抑制された。その結果を表1に示す。

表 1

	動物No.	I g E 抗体価
対照	1	8
	2	6 4
	3	1 6
	4	1 6
	5	3 2
ガゴメ昆布由来	1	8
フコイダン 0. 1 %	2	3 2
	3	3 2
	4	3 2
ガゴメ昆布由来	1	< 2
フコイダン 1 %	2	< 2
	3	< 2
	4	4
	5	8

## 実施例 8

実施例 7 と同様の方法により感作したラットに、初回感作から 1 9 日後に同条件で追加免疫し、最終免疫から 1 4 日後に腹大静脈より血液を採取した。採取した血液は前記同様 P C A 反応で抗原特異的 I g E 量を測定した。

参考例 1 - ( 1 ) で調製したガゴメ昆布由来フコイダンの投与群は追加免疫日から採血日まで 0. 1 % または 1 % のガゴメ昆布由来フコイダンを給水瓶に入れ、自由摂取させた。また対照群では水道水を同様に与えた。その結果、卵白アル

ブミンによる抗原特異的 I g E 量の上昇は 1 % ガゴメ昆布由来フコイダンの飲水摂取により著明に抑制された。このことより、フコイタンは予防的投与に加え、抗原感作時からの治療的投与においても有効であることが示された。その結果を表 2 に示す。

表 2

動物 No.		I g E 抗体力価
対照	1	8
	2	3 2
	3	3 2
	4	3 2
	5	3 2
<hr/>		
ガゴメ昆布由来	1	1 6
フコイタン 0. 1 %	2	1 6
	3	3 2
	4	3 2
<hr/>		
ガゴメ昆布由来	1	2
フコイタン 1 %	2	2
	3	2
	4	4
	5	2

## 実施例 9

(1) 1.5 g 中に、フコイダンとしてガゴメ昆布由来フコイダン 20 mg、ポリフェノールとして市販のリンゴ抽出物（商品名：アップルフェノン、ニッカウキスキー（株）製）、ブドウ種子抽出物（商品名：グラヴィノール、キッコーマン（株）製）、甜茶抽出物（商品名：サンテンチャ S、サントリー（株）製）の合計 82 mg、残余がビーフェキス（大日本製薬（株）製）、ビール酵母（麒麟ビール（株）製）、乳糖、コーンスターチ（加藤化学（株）製）、還元麦芽糖（東和化成工業（株）製）となるように原料を配合し、本発明の飼料添加物（1 mm 径）を押し出し造粒機を用い製造し、一包 1.5 g とした。

(2) 大型犬（体重：約 30 kg）の場合は 1 日 3 包、中型犬（体重：約 10 kg）の場合は 1 日 2 包、小型犬（体重：5 kg）には 1 日 1 包各々の飼料に上記飼料添加剤を栄養補助食として添加した。

本発明の飼料添加剤の摂取により、大型犬、中型犬、小型犬共に活動が活発となり、食欲も増進した。また体調の改善効果により、毛並みが改善され、体臭、糞尿の臭いは軽減した。これらの効果は特に老犬において顕著に見られ、老犬の体調改善、健康回復、若返りに本発明の飼料は極めて有用であった。

## 寄託された生物材料

### (1) 寄託機関の名称

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号（郵便番号 305-8566）

### (2) 寄託された微生物

(i) アルテロモナス (*Alteromonas*) s p. SN-1009

原寄託日 : 平成 8 年 2 月 13 日

国際寄託への移管請求日 : 平成 8 年 11 月 15 日

受託番号： F E R M B P - 5 7 4 7

(ii) フラボバクテリウム (Flavobacterium) s p . S A - 0 0 8 2

原寄託日 : 平成 7 年 3 月 2 9 日

国際寄託への移管請求日 : 平成 8 年 2 月 1 5 日

受託番号： F E R M B P - 5 4 0 2

#### 産業上の利用可能性

本発明によりサイトカイン類産生調節作用、一酸化窒素産生誘導作用、及び抗アレルギー作用を示すフコイダン及び／又はその分解物を有効成分として含有するサイトカイン類産生調節を要する疾患、一酸化窒素産生を要する疾患及びアレルギー性疾患に有効な医薬が提供される。該医薬は、生体内におけるインターロイキン類、インターフェロン類等の産生調節活性を有し、癌、免疫性疾患等のサイトカイン類の産生調節を必要とする疾患の治療剤又は予防剤として有用である。

また特に I F N -  $\gamma$  産生調節剤、I L - 2 産生調節剤、N O 産生誘導剤としてこれらの薬剤の適用を要する疾患の治療剤として有用である。

不必要な状態での免疫系の活性化あるいは増強は、アレルギー、自己免疫疾患等の疾病を惹起する場合があるが、本発明の製剤によるサイトカイン類増強、免疫増強は選択的なものであり、ウイルス感染、あるいは癌等、体内に排除すべき抗原が存在し、細胞性免疫の増強が必要なときのみにより起こることにより、本発明の製剤は生体防御に極めて有用である。

また本発明の製剤により過剰な体液性免疫の活性化が抑制され、本発明の製剤はアレルギーの抑制にも極めて有用である。

更に、サイトカイン類産生調節作用、一酸化窒素産生誘導作用及び抗アレルギー作用を有するフコイダン及び／又はその分解物を用いて飲食品又は飼料を製造

することが可能になり、日常の飲食品として摂取することにより、サイトカイン類の産生調節を要する疾患、一酸化窒素産生を要する疾患、例えば動脈硬化症、アレルギー性疾患等の症状改善等が可能となる。

従って、フコイダン及び／又はその分解物を有効成分とする機能性飲食品又は飼料は、これらの生理作用により、生体の恒常性の維持に有用な機能性飲食品又は飼料である。

またサイトカイン類の産生調節剤も提供され、当該調節剤はサイトカイン類の機能研究、サイトカイン類が関連する疾病用医薬のスクリーニングに有用である。

## 請求の範囲

1. フコイダン及び／又はその分解物を有効成分として含有することを特徴とするサイトカイン類産生調節を要する疾患、一酸化窒素産生を要する疾患、又はアレルギー性疾患の治療剤又は予防剤。
2. フコイダンが藻類由来又は棘皮動物由来である請求項 1 記載の治療剤又は予防剤。
3. サイトカイン類がインターロイキン類又はインターフェロン類である請求項 1 又は 2 記載の治療剤又は予防剤。
4. インターフェロン類がインターフェロン $\gamma$ である請求項 3 記載の治療剤又は予防剤。
5. インターロイキン類がインターロイキン $\gamma$  1 2 である請求項 3 記載の治療剤又は予防剤。
6. アレルギー性疾患が I g E 産生抑制を要する疾患である請求項 1 又は 2 記載の治療剤又は予防剤。
7. 経口用治療剤又は経口用予防剤である請求項 1 ～ 6 いずれか記載の治療剤又は予防剤。
8. フコイダン及び／又はその分解物を含有してなるサイトカイン類産生調節用、一酸化窒素産生誘導用、又は抗アレルギー用の食品、飲料又は飼料である、



サイトカイン類産生調節用食品、飲料又は飼料、一酸化窒素産生誘導用食品、飲料又は飼料、或いは抗アレルギー用食品、飲料又は飼料。

9. フコイダンが藻類由来又は棘皮動物由来である請求項8記載の食品、飲料又は飼料。

10. サイトカイン類がインターロイキン類又はインターフェロン類である請求項8又は9記載の食品、飲料又は飼料。

11. インターフェロン類がインターフェロン- $\gamma$ である請求項10記載の食品、飲料又は飼料。

12. インターロイキン類がインターロイキン-12である請求項10記載の食品、飲料又は飼料。

13. 抗アレルギー用食品、飲料又は飼料がIgE産生抑制用食品、飲料又は飼料である請求項8又は9記載の食品、飲料又は飼料。

14. サイトカイン類産生調節を要する疾患、一酸化窒素産生を要する疾患、又はアレルギー性疾患を治療又は予防するためのフコイダン及び／又はその分解物の使用。

15. サイトカイン類産生調節を要する疾患、一酸化窒素産生を要する疾患、又はアレルギー性疾患の治療剤又は予防剤の製造のためのフコイダン及び／又はその分解物の使用。

16. フコイダン及び／又はその分解物を用いるサイトカイン類産生調節を要する疾患、一酸化窒素産生を要する疾患、又はアレルギー性疾患の治療又は予防方法。

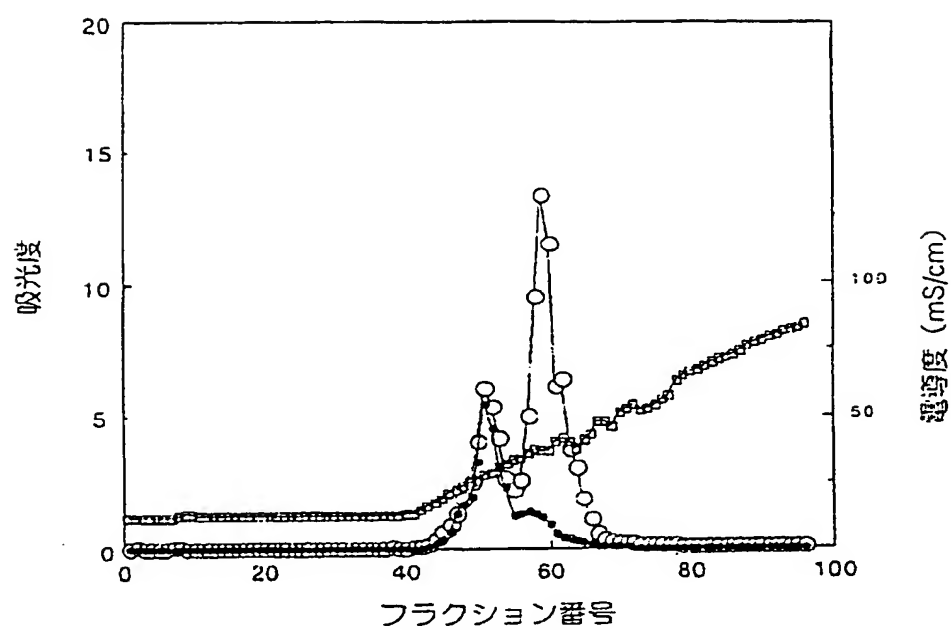
17. フコイダン及び／又はその分解物を有効成分として含有するサイトカイン類産生調節剤、一酸化窒素産生誘導剤、抗アレルギー剤、又はI g E産生抑制剤。

18. サイトカイン類産生調節剤、一酸化窒素産生誘導剤、抗アレルギー剤、又はI g E産生抑制剤の製造のためのフコイダン及び／又はその分解物の使用。

19. サイトカイン類産生調節用食品、飲料又は飼料、一酸化窒素産生誘導用食品、飲料又は飼料、或いは抗アレルギー用食品、飲料又は飼料の製造のためのフコイダン及び／又はその分解物の使用。

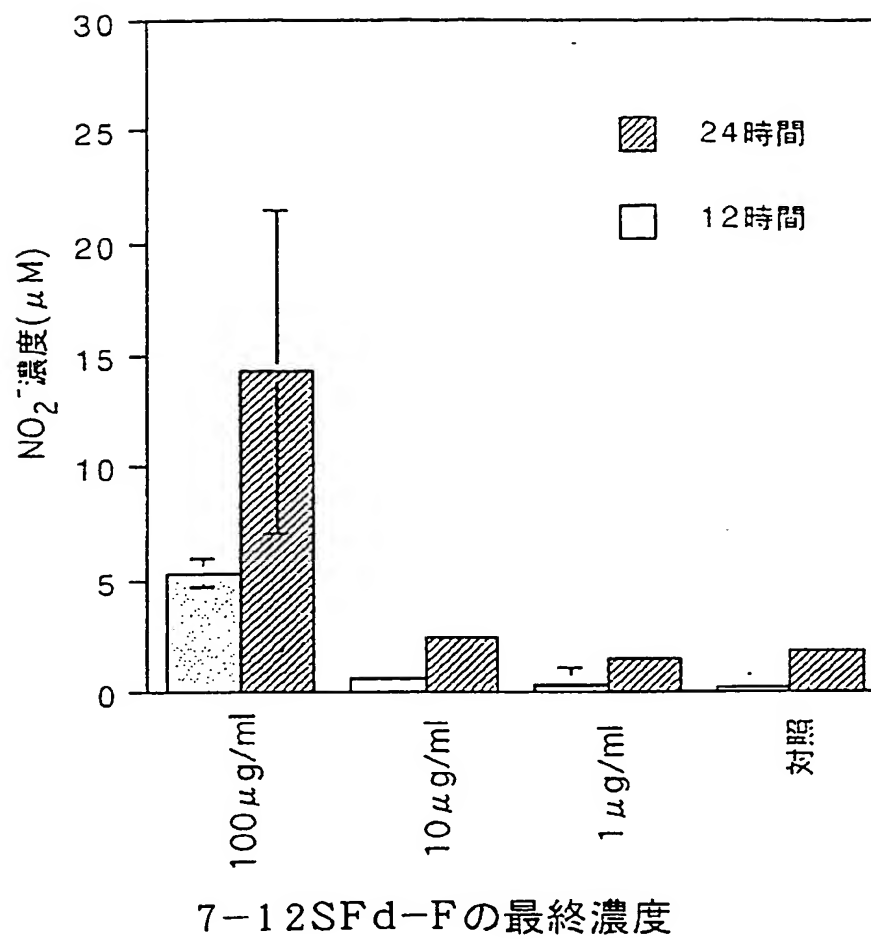
20. フコイダン及び／又はその分解物を有効成分として使用するサイトカイン類産生調節方法、一酸化窒素産生誘導方法、アレルギー抑制方法、又はI g E産生抑制方法。

21. サイトカイン類産生調節、一酸化窒素産生誘導、アレルギー抑制又はI g E産生抑制のためのフコイダン及び／又はその分解物の使用。



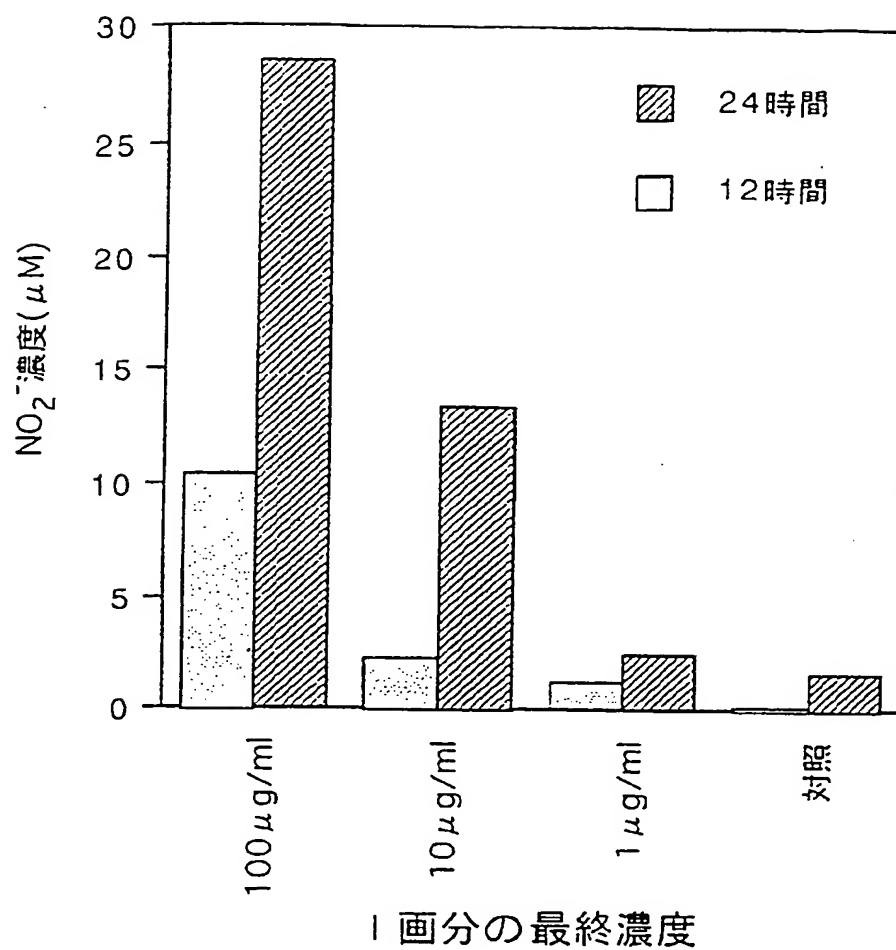
第 1 図

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



第 2 図

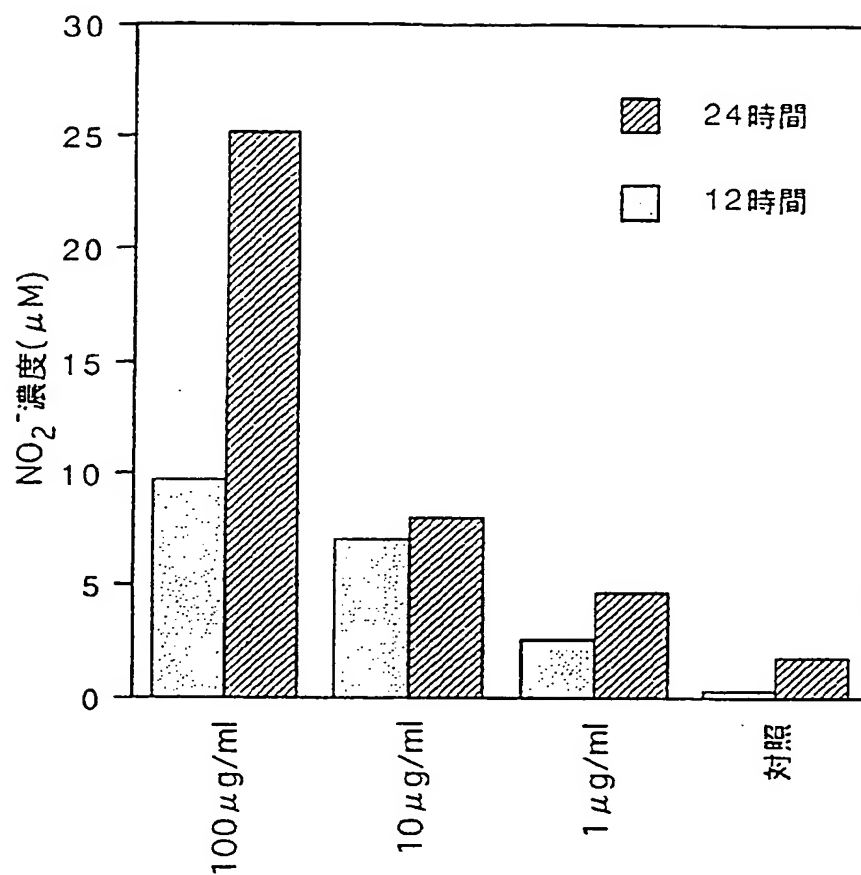
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



第 3 図

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

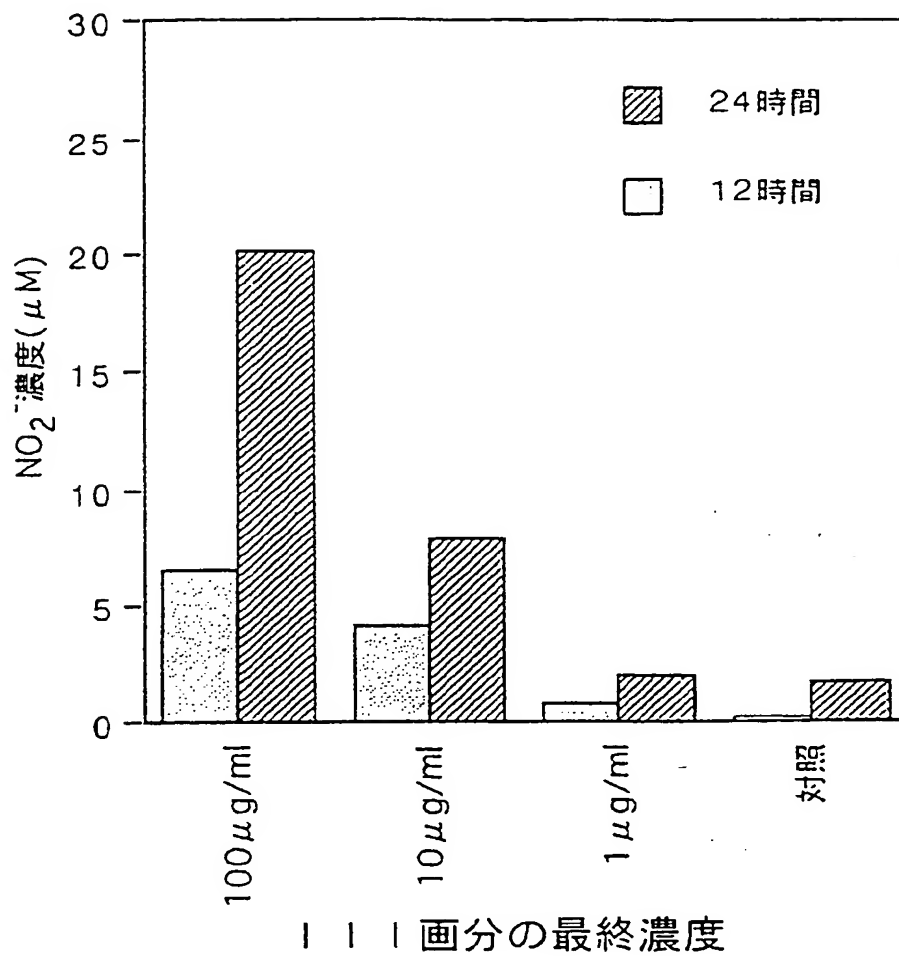




II 画分の最終濃度

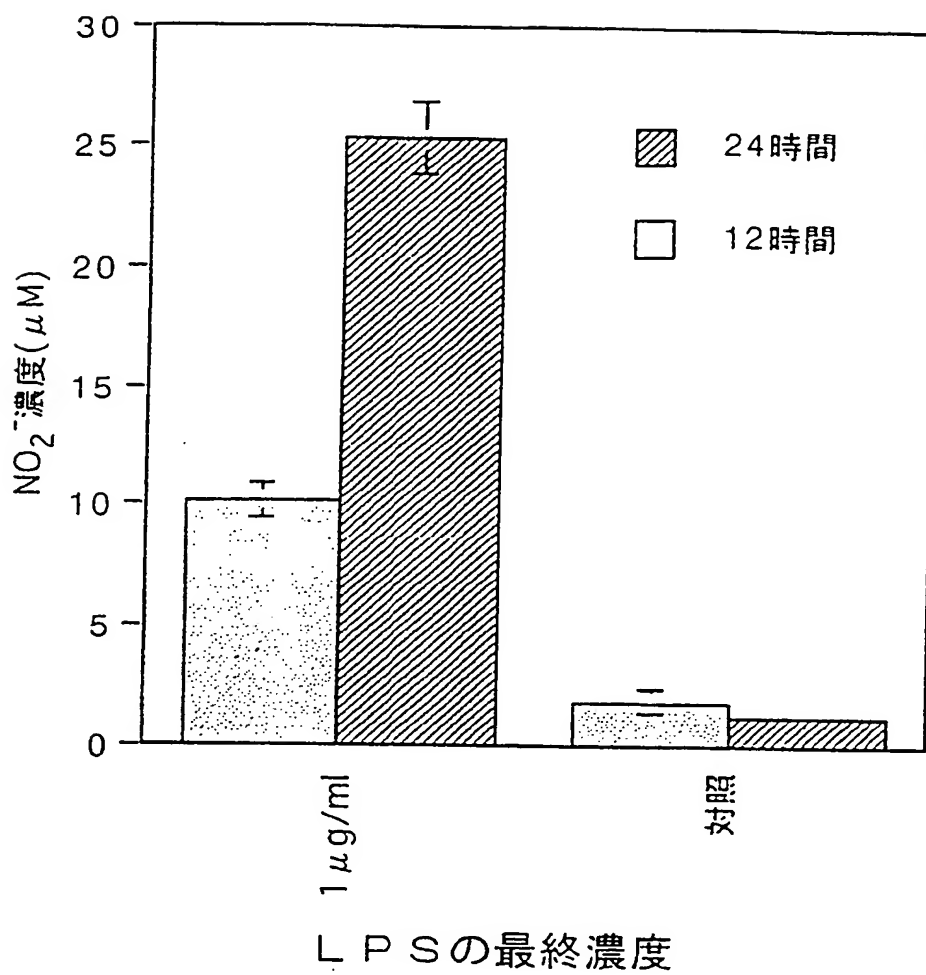
## 第 4 図

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



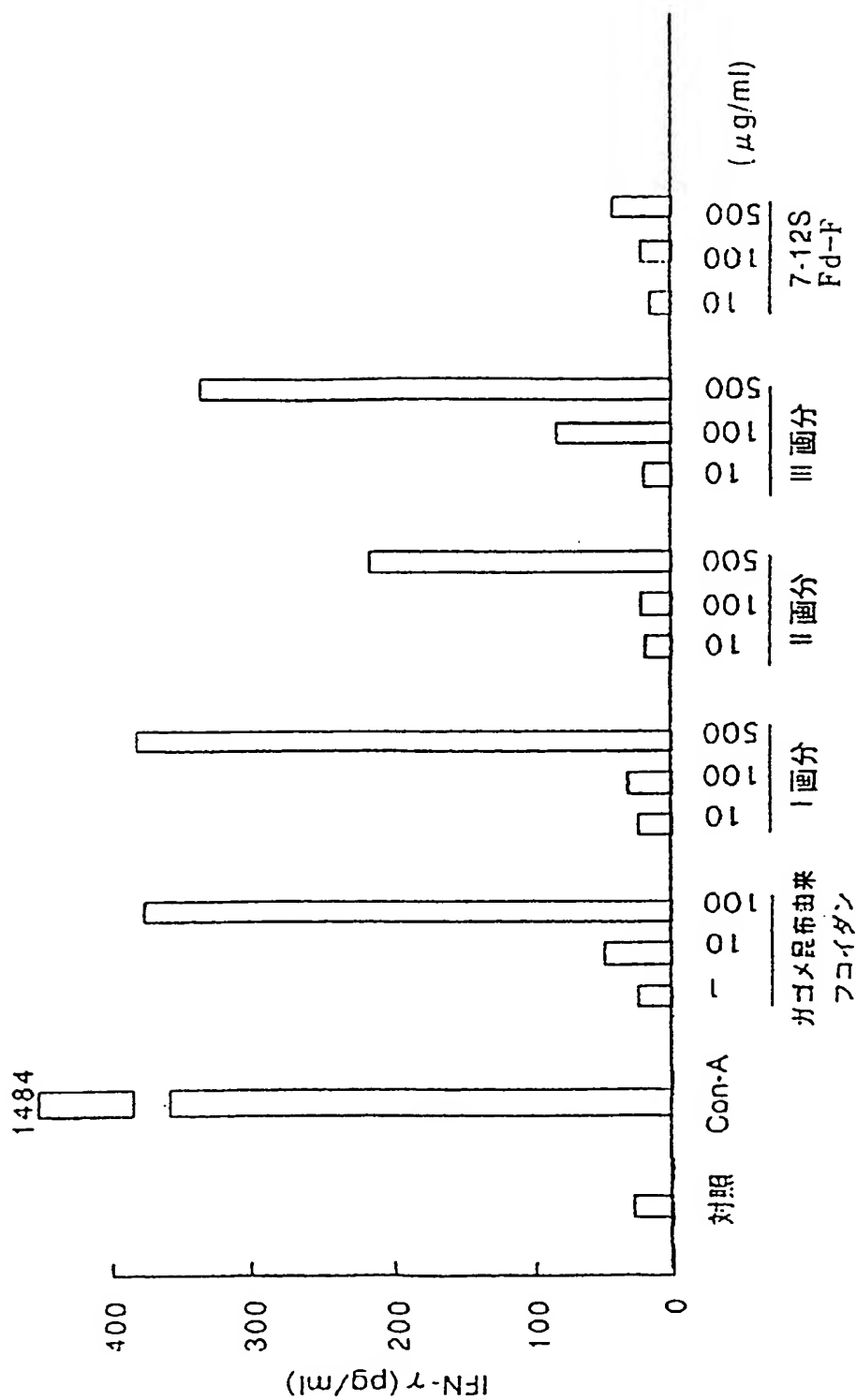
第 5 図

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



第 6 図

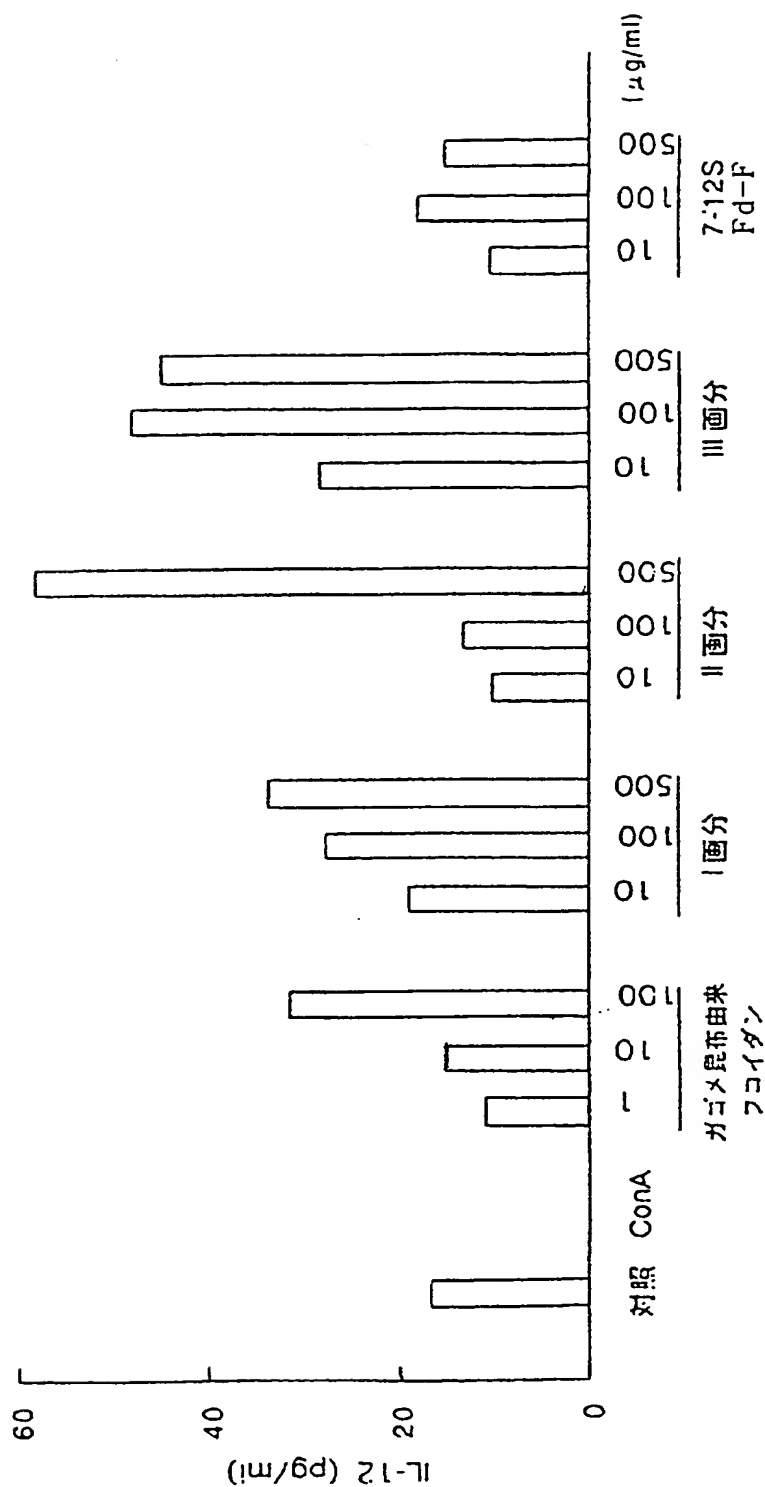
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



第7図

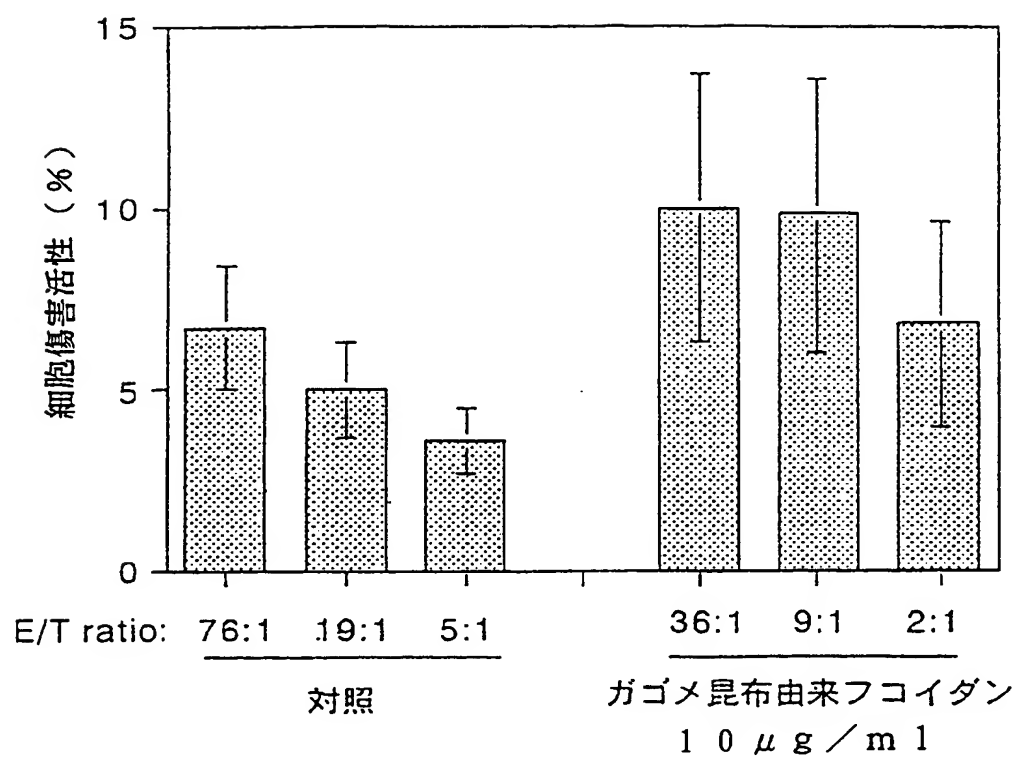
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**





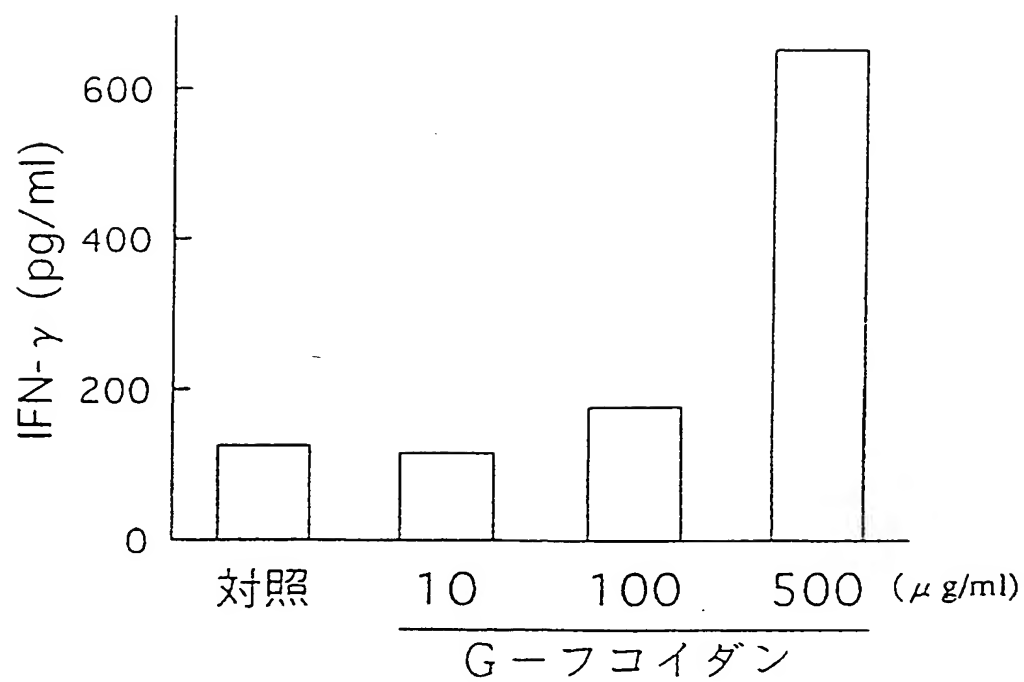
第8図

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



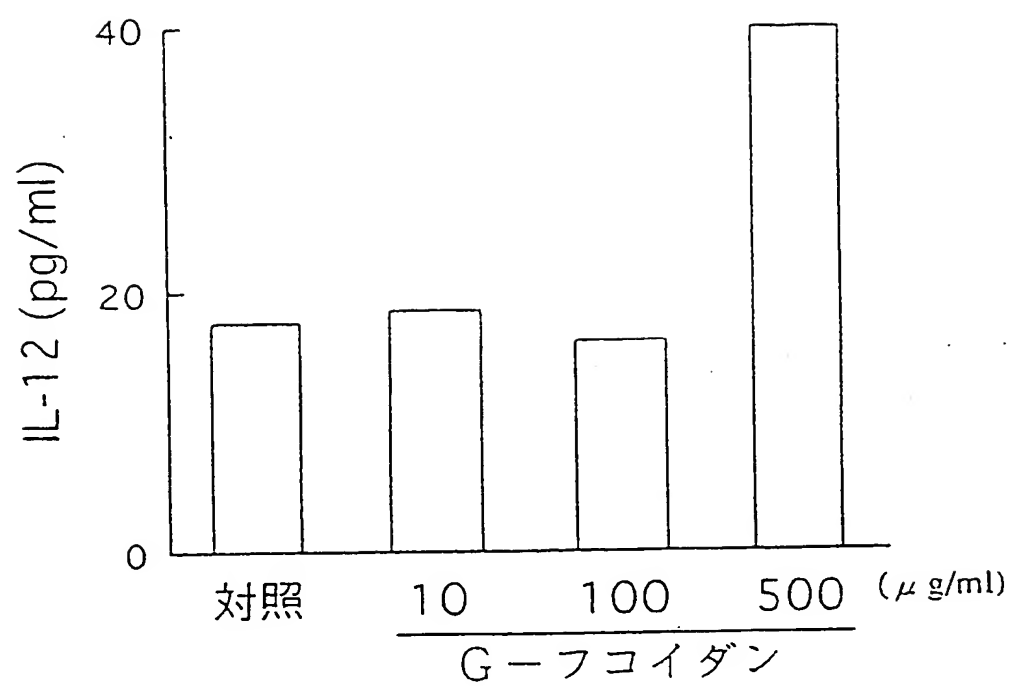
第 9 図

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



第10図

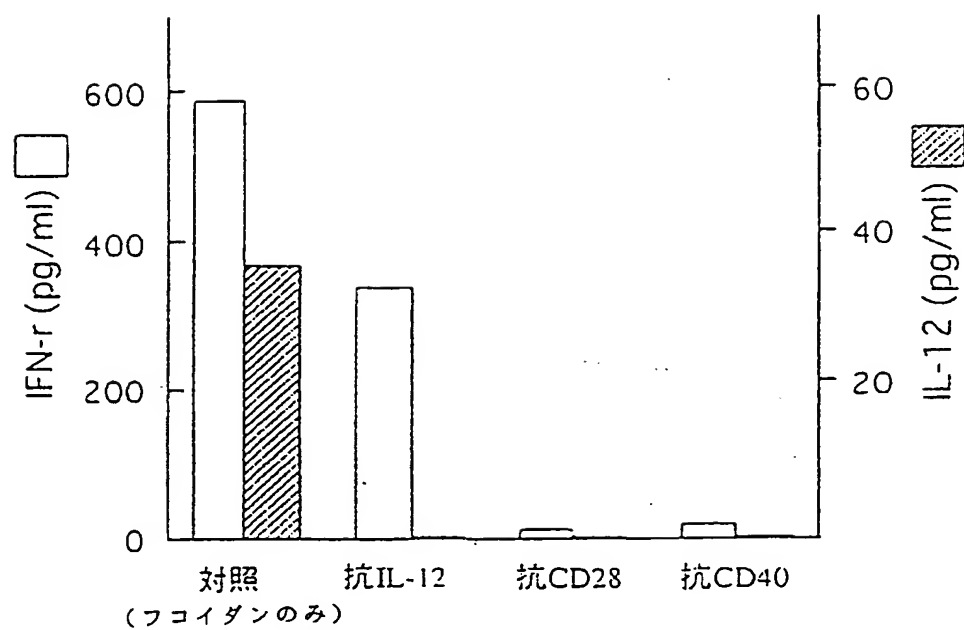
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



第11図

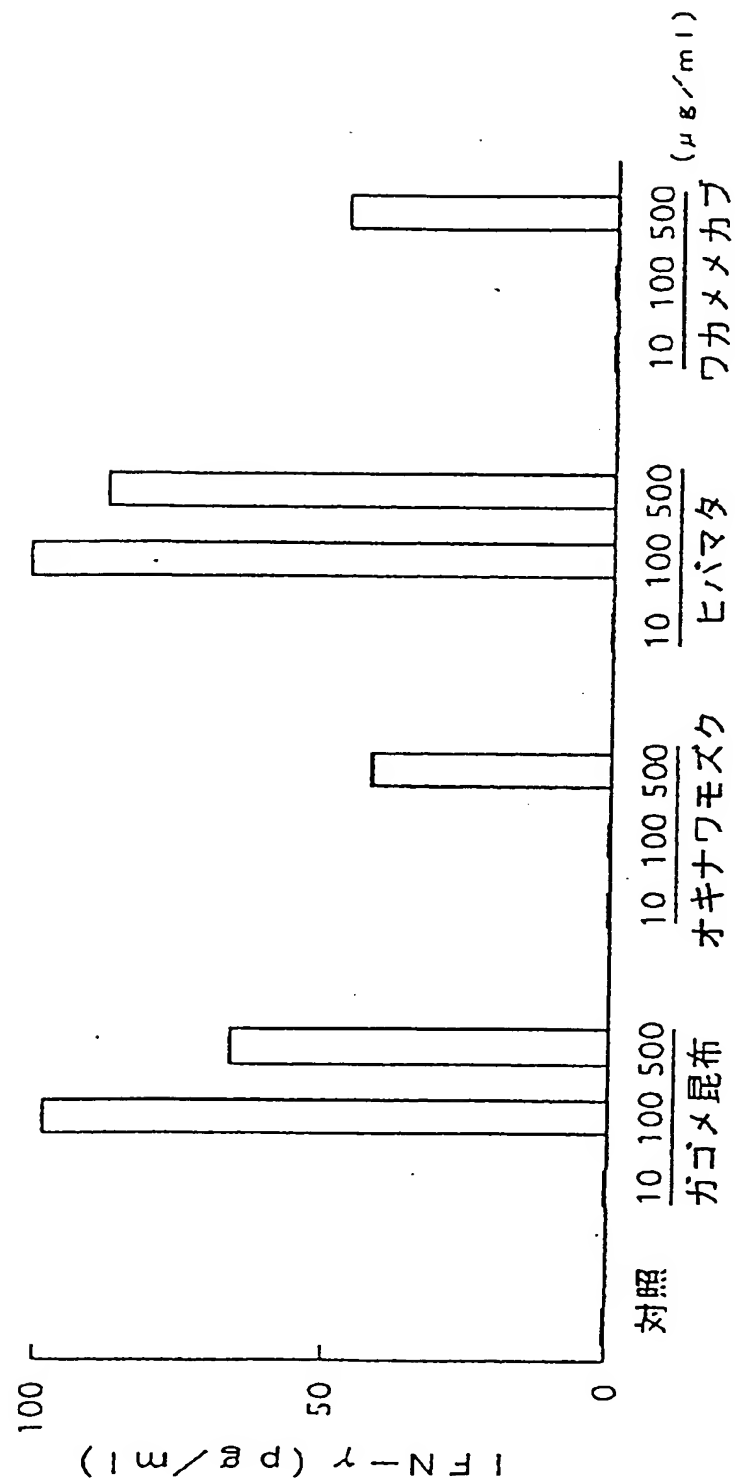
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**





第12図

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



第13図

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05489

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K31/737, 35/80, 35/56, A61P37/02, 43/00,  
37/08//C08B37/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K31/737, 35/80, 35/56, A61P37/02, 43/00,  
37/08//C08B37/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SHUN, Juyun et al, "An experimental study on immunoregulatory effect of fucoidan", Chem. abstr., Vol.124, 1996 (Columbus, OH, USA), the abstract No. 332302, 1995, 14(3), 990-13 (Chinese)	1-4, 7-11, 15, 17-19
X	JP, 9-255577, A (Dainippon Ink and Chemicals, Inc.), 30 September, 1997 (30.09.97), abstract; Claim 3 (Family: none)	1-3, 5, 7-10, 12, 15, 17-19
X	JP, 10-72362, A (Kyodo Nyugyo K.K.), 17 March, 1998 (17.03.98), abstract; Claims (Family: none)	1-3, 6, 7-10, 13, 15, 17-19
X	GRANERT, Carl et al, "Effects of polysaccharide fucoidin on cerebrospinal fluid interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in pneumococcal meningitis in the rabbit", Infect. Immun., 1999, Vol.67, No.5, pp.2071-2074, especially, Abstract	1-3, 7-10, 15, 17-19
A	YOKOKAWA, K. et al, "Heparin regulates endothelin production through endothelium-derived nitric oxide in human	1-3, 7-10, 15, 17-19



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
07 November, 2000 (07.11.00)

Date of mailing of the international search report  
21 November, 2000 (21.11.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05489

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>endothelial cells.", JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, 1993, Vol.92, No.4, pp.2080-5, the whole document</p> <p>WO, 88/05301, A1 (THE AUSTRALIAN NATIONAL UNIVERSITAY), 28 July, 1988 (28.07.88), the whole document</p> <p>&amp; EP, 355088, A1      &amp; US, 5541166, A</p> <p>&amp; JP, 2-502006, A      &amp; EP, 355088, B1</p> <p>&amp; EP, 631784, A1      &amp; EP, 631784, B1</p> <p>&amp; JP, 2701904, B2      &amp; JP, 09-328431, A</p> <p>&amp; IL, 85145, A1      &amp; IL, 106354, A1</p> <p>&amp; CA, 1316828, A1      &amp; AU, 8812410, A1</p> <p>&amp; AU, 605839, B2      &amp; AT, 160941, E</p> <p>&amp; AT, 178212, E</p>	<p>1-3, 7-10, 15, 17-19</p>

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05489

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 14,16,20,21  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 14, 16, 20 and 21 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Claims 1 to 21 pertain to three inventions including remedies or preventives for diseases with a need for the regulation of the production of cytokines, remedies or preventives for diseases with a need for the production of nitrogen monoxide, and remedies or preventives for allergic diseases. Although these remedies and preventives contain the same substance(s) as the active ingredient, the therapeutic uses of these inventions, as technical features thereof, are neither the same nor corresponding to each other. Such being the case, these inventions are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K31/737, 35/80, 35/56, A61P37/02, 43/00,  
37/08//C08B37/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K31/737, 35/80, 35/56, A61P37/02, 43/00,  
37/08//C08B37/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Chem. abstr., Vol.124, 1996(Columbus, OH, USA) the abstract No. 332302, SHUN, Juyun et al, "An experimental study on immunoregulatory effect of fucoidan", 1995, 14(3), 990-13 (Chinese)	1-4, 7-11, 15, 17-19
X	J P, 9-255577, A (大日本インキ化学工業株式会社) 30. 9月. 1997 (30. 09. 97) 【要約】、 【請求項3】 ファミリーなし	1-3, 5, 7-10, 1 2, 15, 17-19

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07. 11. 00

国際調査報告の発送日

21.11.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

滝下 浩一 印

4C

9284

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 10-72362, A (協同乳業株式会社) 17. 3月. 1998 (17. 03. 98) 【要約】、【特許請求の範囲】 ファミリーなし	1-3, 6, 7-10, 13, 15, 17-19
X	GRANERT, Carl et al, "Effects of polysaccharide fucoidin on cerebrospinal fluid interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in pneumococcal meningitis in the rabbit", Infect. Immun., 1999, Vol.67, No.5, pp.2071-2074, 特に、Abstract	1-3, 7-10, 15, 17-19
A	YOKOKAWA, K et al, "Heparin regulates endothelin production through endothelium-derived nitric oxide in human endothelial cells.", JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, 1993, Vol.92, No.4, pp.2080-5, 文献全体	1-3, 7-10, 15, 17-19
A	WO, 88/05301, A1 (THE AUSTRALIAN NATIONAL UNIVERSITY) 28. 7月. 1988 (28. 07. 88) 文献全体 &EP, 355088, A1&US, 5541166, A &JP, 2-502006, A&EP, 355088, B1 &EP, 631784, A1&EP 631784, B1 &JP, 2701904, B2&JP, 09-328431, A &IL, 85145, A1&IL, 106354, A1 &CA, 1316828, A1&AU, 8812410, A1 &AU, 605839, B2&AT, 160941, E &AT, 178212, E	1-3, 7-10, 15, 17-19

## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 14, 16, 20, 21 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求の範囲 14, 16, 20, 21 は治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲 1 - 21 は、サイトカイン類産生調節を要する疾患の治療剤又は予防剤、一酸化窒素産生を要する疾患の治療剤又は予防剤、アレルギー性疾患の治療剤又は予防剤の3つの発明に係るものであり、それらは同一物質を有効成分とするものの、技術的特徴としてのそれら3つの治療用途が、互いに同一でもなく、対応するものでもないから、単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明には当たらない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**